



**UNIVERSIDAD DE CÁDIZ**  
**FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR**



**Reactividad y mecanismos de transporte de alquilbenceno  
lineal sulfonatos (LAS) y sus intermedios de degradación  
en sistemas marinos litorales**

**VÍCTOR MANUEL LEÓN LEÓN**

**JULIO 2001**

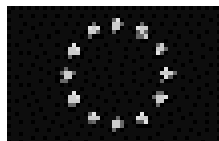


**UNIVERSIDAD DE CÁDIZ**  
**FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR**

**REACTIVIDAD Y MECANISMOS DE TRANSPORTE DE  
ALQUILBENCENO LINEAL SULFONATOS (LAS) Y SUS  
INTERMEDIOS DE DEGRADACIÓN EN SISTEMAS  
MARINOS LITORALES**

**VÍCTOR MANUEL LEÓN LEÓN**

**JULIO 2001**



Esta Tesis Doctoral ha sido realizada dentro del Grupo de Investigación consolidado del Plan Andaluz de Investigación *Oceanografía y Contaminación Litoral* (RNM 144), con la financiación del proyecto de la Unión Europea PRISTINE ("Priority surfactants and their toxic metabolites in waste effluents discharges: an integrate study") incluido dentro del WASTEWATER CLUSTER (ENV4-CT97-0494).

Parte de los resultados se han publicado en *Journal Chromatography A*, 889 (2000) 211 y *Environmental Toxicology and Chemistry* (en prensa), y se han presentado en distintos congresos nacionales e internacionales

Memoria presentada por Víctor Manuel León  
León para optar al grado de Doctor en Ciencias  
Químicas

Víctor Manuel León León

D. EDUARDO GONZÁLEZ MAZO, Profesor Titular del Departamento de Química Física de la Universidad de Cádiz y D. ABELARDO GÓMEZ PARRA, Catedrático del Departamento de Química-Física de la Universidad de Cádiz, como sus directores

HACEN CONSTAR:

Que esta Memoria, titulada **“Reactividad y mecanismos de transporte de alquilbenceno lineal sulfonatos (LAS) y sus intermedios de degradación en sistemas marinos litorales”**, presentada por D. Víctor Manuel León León, resume su trabajo de Tesis y, considerando que reúne todos los requisitos legales, autorizan su presentación y defensa para optar al grado de Doctor en Ciencias Químicas por la Universidad de Cádiz

Cádiz, Abril de 2001

Dr. Eduardo González Mazo

Dr. Abelardo Gómez Parra

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar quiero agradecer al Dr. D. Eduardo González Mazo y al Dr. D. Abelardo Gómez Parra su dirección, ayuda y apoyo en la realización de este trabajo. Este agradecimiento se hace extensivo al Departamento de Química-Física por haberme permitido desarrollar este trabajo, y por supuesto al proyecto europeo PRISTINE dentro del cual se ha desarrollado esta Tesis.

A Dr. D. Jose Antonio Rubio por sus sabios consejos y colaboración, a Dr. D. Angel Del Valls y a Dr. D. Jesús Forja por su ayuda y haber estado dispuestos cuando lo he necesitado. Quiero agradecer especialmente a Eduardo su dedicación y su amistad, que han hecho mas llevadero este camino a veces tortuoso.

A Dori por su amistad y su saber escuchar desde que tengo memoria; a Rocío, Carolina, Idoia, Merche,...por haber compartido tantas carreras y buenos ratos, y especialmente a Mónica compañera donde las haya y “co-sufridora” en el “grupo del LAS” por su inestimable colaboración y amistad.

A Quique por haber sido mucho mas que un compañero de trabajo y apoyarme en los momentos de desánimo, y como no, a Sergio que ha sabido siempre romper la monotonía con una sonrisa y alegrar los días.

A Manolo Fernández por estar siempre dispuesto a ayudar y también por los análisis de nutrientes que ha realizado. A Manolo “el Checo” por realizar los conteos de bacterias y por contactar con el Instituto de Sevilla para su identificación. A Dominico y Cristina (Química Analítica) por su dedicación y ayuda en los análisis de LC/MS. Este trabajo no hubiera sido tampoco posible sin los patrones de los compuestos utilizados para este estudio, por ello quiero agradecer a D. Alfonso Moreno y D. Jose Luis Berna (PETRESA) por haber suministrado los homólogos de LAS, así como a Jennifer Field (Universidad de Oregón) y Francesc Ventura (AGBAR) por suministrar parte de los homólogos de ácidos sulfonilcarboxílicos.

No me puedo olvidar de mis comienzos en el Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía cuyo personal es también responsable de que esto haya salido adelante, en especial a D<sup>a</sup>

María Francisca Osta por su dedicación y por haberme iniciado en el mundo del laboratorio, y también como no a Julián Blasco e Isabel Fernández.

Quiero valorar el buen hacer de algunas personas de esta universidad (Ana, Enrique, Mario,...) que han facilitado día a día con su labor la realización de esta tesis.

No menos importante ha sido mi familia (padres, hermanos, cuñada,...), apoyo indispensable en este trabajo, ya que a pesar de la distancia han sabido estar muy presentes y me han apoyado en todo momento.

Quiero agradecer también los ánimos y los buenos ratos que me han hecho pasar Jose y Laura, gracias por ser buenos compañeros de batalla.

A Pepa, Narci, Javi y Paco, que aún estando lejos han sido constantes en su apoyo y ánimo, y especialmente a Jose Luis por su apoyo incondicional y haber estado al pie del cañón en todo momento.

A todos mi más sincero agradecimiento.

A aquellos que la han hecho posible



## ACRÓNIMOS

LAS	alquilbenceno lineal sulfonato/s
SPC	ácido sulfofenilcarboxílico/s
SPDC	ácido sulfofenildicarboxílico/s
LAB	alquilbenceno lineal
Iso-LAS	alquilbenceno sulfonato/s con un grupo metilo en la cadena alquímica
DATS	dialquiltetralinas sulfonada/s
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
FL	detector de fluorescencia
LC	cromatografía líquida
GC	cromatografía de gases
MS	espectrometría de masas
TEAHS	hidrogenosulfato de tetraetil amonio
C <sub>2</sub>	di-sílice
C <sub>8</sub>	octilsílice
C <sub>18</sub>	octadecilsílice
SAX	intercambio aniónico fuerte
GCB	carbono negro grafitizado
Kd	Coeficiente de partición

## ÍNDICE

	<b>Página</b>
<b>1. PREÁMBULO Y OBJETIVOS</b>	<b>1</b>
Propiedades quimicofísicas del LAS	4
Importancia del LAS como tensioactivo comercial	6
Comportamiento ambiental del LAS y los SPC	8
Objetivos	10
Bibliografía	12
 <b>2. ANÁLISIS DEL ALQUILBENCENO LINEAL SULFONATO (LAS) Y SUS INTERMEDIOS DE DEGRADACIÓN (ÁCIDOS SULFOFENILCARBOXÍLICOS) EN MUESTRAS DE ORIGEN MARINO Y ESTUÁRICO</b>	 <b>13</b>
2.1. Introducción y objetivos específicos	15
2.1.1. Separación y detección de LAS y SPC	15
2.1.2. Extracción, aislamiento y concentración de LAS y SPC	20
A. Tratamiento de muestras sólidas	20
B. Extracción en fase sólida del LAS y los SPC	20
Objetivos específicos	24
2.2. Materiales	25
2.2.1. Procedencia de los patrones de LAS y SPC. Composición y pureza	25
2.2.2. Reactivos y material utilizado	25
2.3. Metodología de análisis	26
2.3.1. Análisis de LAS y SPC por HPLC	26
2.3.2. Pretratamiento de las muestras sólidas	27
2.3.3. Extracción en fase sólida	28

	<b>Página</b>
2.4. Resultados y discusión	30
2.4.1. Separación y detección de LAS y SPC	30
2.4.2. Extracción Soxhlet	32
2.4.3. Extracción en fase sólida	34
A. Minicolumna no polar (C <sub>18</sub> , Lichrolut EN , Bond Elut C <sub>18</sub> )	35
B. Minicolumna de intercambio aniónico (SAX)	38
C. Método propuesto	39
2.4.4. Prestaciones del método	40
A. Volumen de ruptura	41
B. Curvas de calibración y límite de detección	41
2.5. Bibliografía	44
 <b>3. BIODEGRADACIÓN DEL ALQUILBENCENO LINEAL SULFONATO (LAS) EN EL MEDIO MARINO</b>	 51
3.1. Introducción y objetivos específicos	53
3.1.1 Mecanismo de biodegradación del LAS	54
A. Oxidación de la cadena alquílica	56
B. Ruptura del anillo aromático y desulfonación	58
C. Mineralización	59
3.1.2. Estudios de biodegradación en el laboratorio	61
3.1.3. Factores que afectan a la degradación del LAS	62
A. Factores que dependen de la estructura molecular y de la concentración	62
B. Factores ambientales	63
3.1.4. Cinética del proceso de biodegradación del LAS	68

	<b>Página</b>
Objetivos específicos	71
3.2. Material y métodos	72
3.2.1. Naturaleza del LAS y características del agua de mar	72
3.2.2. Selección del reactor aeróbico	75
3.2.3. Ensayos de biodegradación realizados y sistemática de muestreo	78
3.2.4. Análisis de LAS y SPC en los reactores aeróbicos	79
3.2.5. Recuento de microorganismos	81
3.3. Resultados y discusión	82
3.3.1. Biodegradación primaria del LAS	82
A. Cinética de degradación primaria del LAS	85
B. Influencia de la adición de inóculo	88
C. Influencia de la temperatura	92
D. Influencia de la naturaleza del LAS: longitud de cadena y composición isomérica	94
3.3.2. Contribución a la caracterización de la ruta de biodegradación del LAS	96
3.3.3. Formación de los ácidos sulfofenilcarboxílicos a partir del LAS	107
A. Ajuste cinético de formación-degradación de los ácidos sulfofenilcarboxílicos	107
B. Efecto del inóculo	109
C. Efecto de la temperatura	111
D. Influencia de la estructura molecular: longitud de la cadena alquílica, composición isomérica y presencia de un grupo carboxílico terminal	114
3.3.4. Evolución y caracterización de la población bacteriana durante la degradación del LAS	117

3.4. Bibliografía	122
<b>4. ADSORCIÓN DEL ALQUILBENCENO LINEAL SULFONATO (LAS) Y SUS INTERMEDIOS DE DEGRADACIÓN EN SEDIMENTOS MARINOS</b>	<b>133</b>
4.1. Introducción y objetivos específicos	135
4.1.1. Caracterización en experimentos de laboratorio	137
A. Concentración de sólidos en suspensión en la columna de agua, contenido en carbono orgánico y granulometría del sedimento	140
B. Fuerza iónica y pH	141
C. Contenido en iones y precipitación	141
4.1.2. Isotermas de adsorción	142
Objetivos	145
4.2. Material y métodos	146
4.2.1. Estimación del tiempo de equilibrio	148
4.2.2. Ensayos de adsorción y desorción	148
4.3. Resultados	150
4.3.1. Cinética del proceso de adsorción	151
4.3.2. Adsorción del p-undecilbenceno sulfonato (C <sub>11</sub> LAS) y del ácido p-sulfofenilundecanoico (C <sub>11</sub> SPC) sobre la superficie del recipiente utilizado en los ensayos	152
4.3.3. Adsorción-desorción de p-undecilbenceno sulfonato (C <sub>11</sub> LAS) sobre sedimento marino	154
4.3.4. Adsorción-desorción de ácido sulfofenilundecanoico (C <sub>11</sub> SPC) sobre sedimento marino	160
4.3.5. Valores de $\Delta H$ , $\Delta S$ y $\Delta G$ para la adsorción del C <sub>11</sub> LAS y el C <sub>11</sub> SPC	161
4.3.6. Adsorción de los homólogos de LAS y SPC (C <sub>10</sub> -C <sub>13</sub> )	164
4.4. Bibliografía	167

	<b>Página</b>
<b>5. NIVELES DE ALQUILBENCENO LINEAL SULFONATOS Y ÁCIDOS SULFOFENILCARBOXÍLICOS EN SISTEMAS LITORALES</b>	<b>171</b>
5.1. Introducción y objetivos específicos	173
5.1.1. Comportamiento del LAS en el medio	175
A. Ríos	176
B. LAS en sistemas estuáricos y marinos	178
Objetivos específicos	181
5.2. Material y métodos	182
5.2.1. Áreas de estudio	182
A. Estuarios	182
B. Medio marino	186
5.2.2. Sistemática de muestreo y preparación de muestras	188
A. Muestreo en estuarios	188
B. Muestreo en la columna sedimentaria	189
C. Exportación-importación de LAS en el caño de Sancti-Petri	189
D. Tratamiento de las muestras	190
5.3. Resultados y discusión	191
5.3.1. Niveles de LAS y SPC en sistemas estuáricos y marinos	191
5.3.2. Distribución espacial del LAS y los SPC en sistemas estuáricos	167
5.3.3. Distribución temporal de LAS y SPC en la columna de agua: caño de Sancti Petri (bahía de Cádiz)	202

	<b>Página</b>
5.3.4. Estimación del flujo de LAS y SPC desde el caño de Sancti Petri a la bahía de Cádiz	206
5.3.5. Distribución de LAS y SPC en sedimentos marinos	
5.4. Bibliografía	215
<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>223</b>

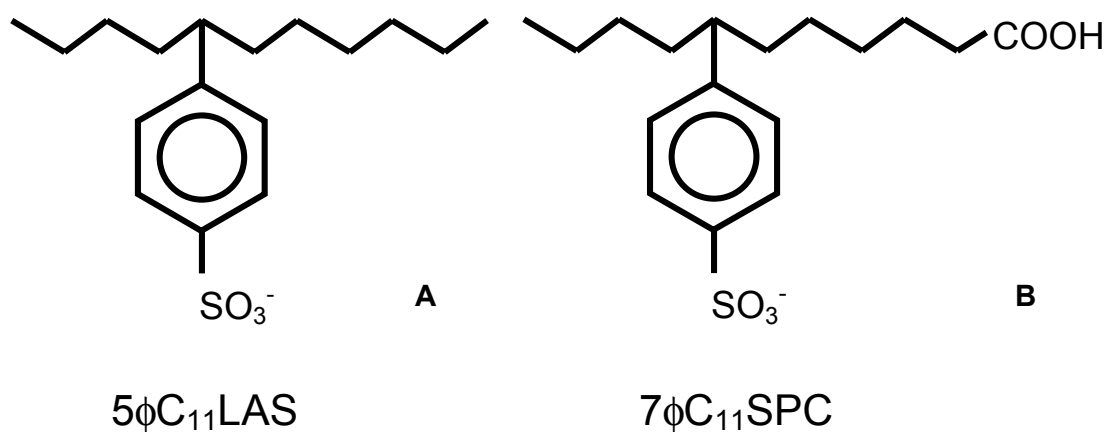


## **1. PREÁMBULO Y OBJETIVOS**

## 1. PREÁMBULO Y OBJETIVOS

Esta tesis se encuadra dentro del creciente interés existente sobre el establecimiento del comportamiento ambiental (origen, transporte, distribución y transformación) de los compuestos orgánicos de síntesis. El estudio se ha realizado sobre los alquilbenceno lineal sulfonatos (LAS), que son los tensioactivos aniónicos de mayor uso en los detergentes domésticos e industriales, y sus intermedios de degradación: los ácidos sulfofenilcarboxílicos (SPC). El estudio se ha centrado en los sistemas litorales someros, tanto marinos como estuáricos, en los que el conocimiento acerca de sus implicaciones ambientales es especialmente escaso.

La molécula del alquilbenceno lineal sulfonato consta de un anillo bencénico al que están unidos un ión sulfonato y una cadena alquímica lineal en posición *para*. En el producto comercial el número de carbonos de esta cadena varía desde 10 a 14. Cada uno de estos homólogos puede presentar, a su vez, diversos isómeros posicionales en función de la situación del enlace del grupo fenilo a la cadena hidrocarbonada. La nomenclatura de estos compuestos adopta la forma abreviada  $m\phi C_n$ -LAS, donde  $n$  es el número de átomos de carbono de la cadena alquímica y  $m$  identifica el átomo de carbono de la cadena alquímica donde se produce el enlace del grupo sulfofenilo. En la figura 1.1a se muestra un esquema de la estructura molecular de un isómero del LAS( $5\phi C_{11}$ -LAS).



**Figura 1.1. Estructura molecular de un isómero del alquilbenceno lineal sulfonato ( $5\phi C_{11}$ -LAS) y del ácido sulfofenilcarboxílico ( $7\phi C_{11}$ -SPC).**

La estructura de los ácidos sulfofenilcarboxílicos (SPC), intermediarios procedentes de la degradación primaria de LAS, es similar a la del LAS. La principal diferencia radica en la existencia de grupos ácidos en el extremo de la cadena alquílica como consecuencia de la oxidación del compuesto inicial. En la figura 1.1b se muestra el esquema de la estructura molecular de uno de los isómeros del ácido sulfofenilcarboxílico de siete átomos de carbono en la cadena carboxílica (7 $\phi$ C<sub>11</sub>-SPC).

### Propiedades quimicofísicas del LAS

Las propiedades quimicofísicas de las moléculas de LAS y de SPC vienen determinadas por su estructura molecular. El LAS presenta un grupo no polar (cadena hidrocarbonada) y una parte polar (grupo sulfonato), es decir una estructura anfifílica que le confiere su actividad superficial o tensioactiva. En disolución, las moléculas se concentran en la interfase aire-agua con el grupo hidrófilo orientado hacia la fase acuosa (Fig. 1.2), o se asocian entre ellas, a partir de una determinada concentración

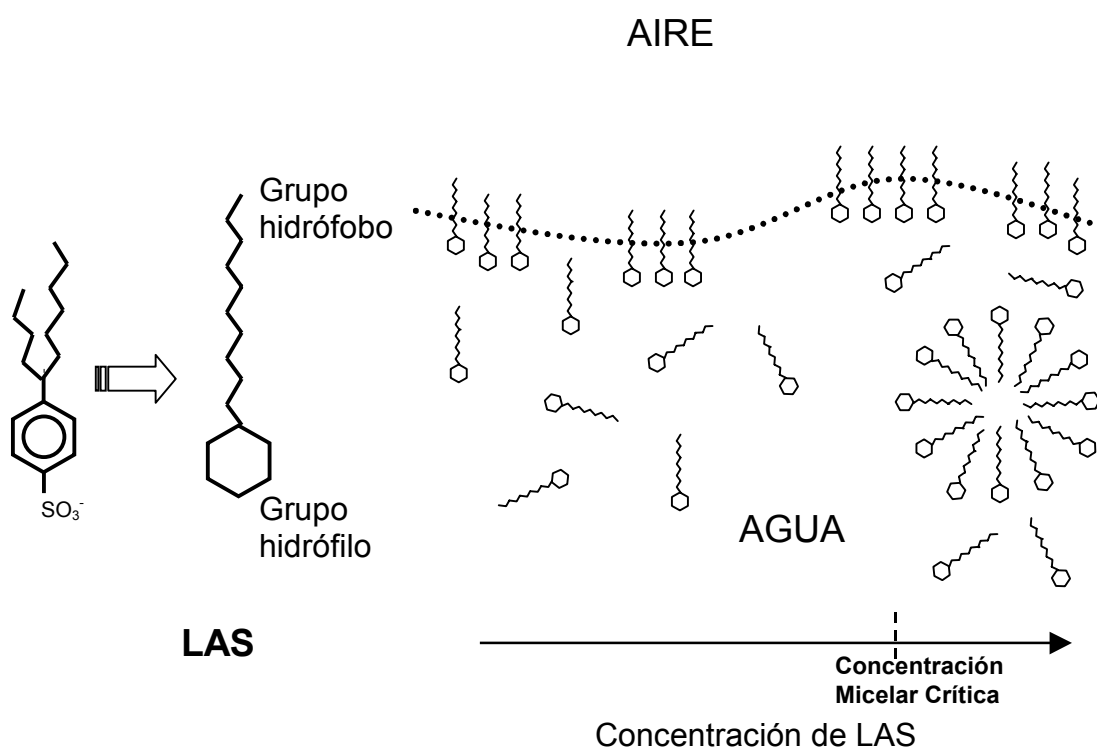


Figura 1.2. Esquema de la distribución del LAS en disolución y en la interfase agua-aire (adaptado de West y Harwell, 1992).

(concentración micelar crítica, CMC), formando agregados moleculares (micelas, cristales líquidos liotrópicos o capas multimoleculares). Como consecuencia se produce una reducción de la tensión superficial del disolvente, de ahí su utilidad como materia activa en la formulación de los detergentes. Este efecto se acentúa a medida que aumenta la longitud de cadena de los homólogos de LAS, y para un homólogo determinado es mayor cuando la unión al anillo bencénico se produce en los carbonos más alejados de los extremos de la cadena alquílica (Smith, 1997).

El LAS puede presentar interacciones hidrófobas a través de su cadena alquílica e interaccionar de forma electrostática con moléculas o iones de carga positiva por el grupo sulfonato. Las principales características físico-químicas del LAS se recogen en la tabla 1.1. Para los SPC no se dispone, hasta el momento, de esta información. El LAS, en forma de sal sódica -como existe en el producto comercial-, es una sustancia soluble en agua. La solubilidad disminuye con el aumento de la longitud de la cadena y, para un mismo homólogo, a medida que los isómeros son más internos (Smith, 1997). Su elevada afinidad por el medio acuoso es confirmada por su reducida presión de vapor, siendo prácticamente nula su vaporización hacia el aire (Folke y Landner, 2000).

**Tabla 1.1. Principales propiedades físico-químicas del alquibenceno lineal sulfonato.**

Propiedad	Valor	Referencia
Peso molecular medio	342 g·mol <sup>-1</sup>	Berna y Cavalli, 1999
C.M.C.	410 mg·L <sup>-1</sup>	Haigh 1996
Punto de fusión	276.8 °C	Berna y Cavalli, 1999
Punto de ebullición	637.4 °C	“
Gravedad específica	1.06 g·cm <sup>-3</sup>	“
Presión de vapor (25°C)	1.28×10 <sup>-14</sup> mm Hg	“
Log K <sub>ow</sub>	2.0152	“
Solubilidad NaLAS	250 g·L <sup>-1</sup>	“
Solubilidad CaLAS <sub>2</sub>	4 mg·L <sup>-1</sup>	“

El coeficiente de partición octanol-agua (K<sub>ow</sub>) denota una cierta afinidad también por la materia orgánica, que aumenta con la longitud de la cadena alquílica. Esta propiedad es utilizada usualmente como un indicador de la afinidad de los contaminantes orgánicos por la fase sólida en los sistemas acuáticos (Amano *et al.*, 1989).

El LAS en forma de sal magnésica es más activo superficialmente, más soluble y viscoso, más estable en aguas duras, y presenta una menor CMC que el LAS cálcico. Por tanto presenta un mayor poder humectante a durezas baja y media (Cohen *et al.*, 1998). Un exceso de calcio o magnesio en el agua, dará lugar a la formación de complejos con LAS poco solubles (Holmstrup y Krogh, 1999). En el caso del  $\text{Ca}(\text{LAS})_2$ , su producto de solubilidad oscila entre  $2.2 \times 10^{-12}$  para el  $\text{C}_{10}\text{LAS}$  y  $9.0 \times 10^{-14}$  para el  $\text{C}_{14}\text{LAS}$  (Verge *et al.*, 2001).

### ***Importancia del LAS como tensioactivo comercial***

El alquilbenceno lineal sulfonato es, con un 12% del consumo mundial de tensioactivos, el más usado en la formulación de detergentes, tan solo superado por los jabones (Berna y Cavalli, 1999). Este porcentaje aumenta si consideramos sólo los detergentes de uso doméstico, ya que su consumo en la Unión Europea constituyó en 1998 el 27% del total. Durante este mismo año el consumo medio de LAS por habitante en la Unión Europea ascendió  $3.1 \text{ g LAS} \cdot \text{día}^{-1}$  y en España a  $5 \text{ g LAS} \cdot \text{día}^{-1}$  (Berna y Cavalli, 1999). La distribución porcentual de los homólogos del LAS comercial utilizado en Europa es del 15, 30, 30 y 25% para el  $\text{C}_{10}$ ,  $\text{C}_{11}$ ,  $\text{C}_{12}$  y  $\text{C}_{13}$  respectivamente. El producto tiene una longitud media de cadena de 11.6 y un peso molecular promedio como sal sódica de  $342 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$  (Tabla 1.1).

En la tabla 1.2 se indica el porcentaje en peso de LAS en distintas presentaciones de detergentes, que en algunos casos supera el 10%. La producción de LAS se ha estabilizado en los últimos años, y en lo que respecta a su consumo, la tendencia a nivel internacional muestra una ligera reducción para este compuesto, frente al aumento en la utilización de otros tensioactivos aniónicos (alcanosulfonatos, alcohol éter sulfatos,...) o no iónicos (alcohol etoxilados,...) (Dobson, 2000). En los últimos años se están desarrollando tensioactivos a partir de aceites de origen vegetal o animal, a diferencia de los utilizados mayoritariamente hasta la fecha que son sintetizados a partir de derivados del petróleo. Sin embargo estos tensioactivos todavía constituyen un porcentaje muy bajo del total consumido.

**Tabla 1.2. Porcentaje de LAS en peso presente en la formulación de detergentes de distinto uso (Berna y Cavalli, 1999).**

Tipo de detergente	LAS (% en peso)
En polvo concentrado	5-15
En polvo concentrado-Compacto	0-15
En polvo concentrado-Tabletas	2-10
En polvo (cuidado de tejidos)	10-20
Lavavajillas (a mano)	5-25
Líquido concentrado	0-20
Lavavajillas (pasta o gel)	10-20
Fregasuelos	0-5

El alquilbenceno lineal sulfonato sódico se prepara a partir de una alquilación de Friedel Crafts del benceno y una subsiguiente sulfonación del anillo aromático, preferentemente en posición *para* (Terzic *et al.*, 1992). El procedimiento utilizado comercialmente en España por Petroquímica Española S.A. para “alquilación” del benceno en la producción del LAB, usa el ácido fluorhídrico como catalizador. Con ello se generan en la producción del LAB porcentajes muy bajos de dialquiltetralinas (0.5%), y se obtiene un LAS con una longitud de cadena media de 11 a 13 átomos de carbono y con un 15-20 % de isómero 2-fenilo (Smith, 1997). Como subproductos de la síntesis del LAS en el producto comercial existen alquilbencenos lineales sin sulfonatar y trazas de dialquiltetralinas sulfonadas (DATS), además de alquilbencenos con un metilo ramificado (iso-LAS).

El LAS se introdujo a mediados de los 60 para sustituir a los alquilbencenos ramificados (tetrapropilenbenceno sulfonatos, TBS), que por su baja degradabilidad ocasionaron numerosos problemas medioambientales. Desde entonces, su uso ha sido generalizado y también el interés de su estudio, por tratarse de una de las sustancias orgánicas xenobióticas de más amplia utilización a nivel mundial ( $2.2 \cdot 10^6$  ton·año<sup>-1</sup>, Berna y Cavalli, 1999).

En la actualidad la legislación ambiental española no permite la comercialización de tensioactivos con menos del 90-92% de biodegradabilidad. Aunque este porcentaje pudiera considerarse restrictivo, debe tenerse en cuenta que se refiere sólo a la biodegradación primaria (pérdida de tensioactividad) y que los ensayos para la

homologación del tensioactivo están establecidos en condiciones muy favorables (alimentación en discontinuo, aireación,...). El LAS cumple los requisitos legales en cuanto a su biodegradabilidad y, por tanto, está considerado como no nocivo para el medio ambiente según la Directiva de la Unión Europea 67/548 en su decimoctava Adaptación al Progreso Técnico. Decisiones recientes de los gobiernos y organismos reguladores confirman que el LAS, según la normativa actual, es un producto seguro desde el punto de vista ambiental y apto para su uso en detergentes de lavado y productos de limpieza.

Actualmente, la Unión Europea está desarrollando criterios para establecer el ecoetiquetado de varios grupos de productos. El criterio que se aplicará en la UE para informar a los consumidores de los productos con bajo impacto ambiental (Diario Oficial de la UE, 1992), fue aprobado para detergentes de limpieza por el Comité Representativo del Ecoetiquetado de la UE en 1995 (Diario Oficial de la UE, 1995). La adecuación del LAS a estos criterios se reconoce por su inclusión en la lista de ingredientes de los detergentes, aunque se limita la cantidad que se puede adicionar del mismo. Los criterios de ecoetiquetado están siendo revisados en la actualidad y se pretende incluir, entre otros, a la biodegradación anaerobia como un elemento a tener en cuenta para establecer el impacto ambiental de los tensioactivos.

### ***Comportamiento ambiental del LAS y los SPC***

El comportamiento ambiental de cualquier contaminante orgánico viene dado, además de por su producción y consumo, por el binomio “transporte+reactividad”. Lo primero por lo que afecta a la extensión espacial de su presencia en el medio y, lo segundo, porque determina su persistencia en la zona en la que ha sido vertido.

El estudio del transporte de un contaminante dado obliga a considerar los distintos procesos involucrados en su reparto en la lámina de agua, entre la fase disuelta y la fase sólida (sólidos en suspensión, ya sea material detrítico o microorganismos), y establecer las condiciones hidrodinámicas de la zona en estudio. En el caso de los tensioactivos ha de considerarse también su capacidad de incorporarse a la interfase agua-atmósfera, debido a que esta acumulación superficial puede afectar a su dispersión por mecanismos poco relevantes para otras sustancias que no presentan actividad superficial. Estas vías de transporte, poco usuales, están provocadas por la acción del viento sobre el

movimiento de las monocapas superficiales, y sobre la formación de aerosoles y su posterior arrastre vía atmosférica. Sobre este particular, a pesar de que el LAS es una sustancia no volátil, se ha comprobado recientemente su inclusión en aerosoles marinos que se generan cuando se producen temporales en los lugares de la costa en que se producen vertidos residuales que contienen este tensioactivo (J.M. Bayona, comunicación personal).

La característica de ser superficialmente activos obliga también a considerar de una manera especial la toma de muestras en el estudio del comportamiento ambiental de estos compuestos y en los ensayos que se realicen con ellos en el laboratorio. En estos casos, el “tamaño mínimo de muestreo” ha de establecerse teniendo en cuenta tanto el volumen y profundidad de las muestras que se toman como la homogeneización previa a su adquisición. En esta memoria se hacen algunas consideraciones al respecto.

En relación a la reactividad de los contaminantes orgánicos deben tenerse en cuenta los distintos procesos por los que se produce su eliminación del medio: su destrucción fisicoquímica, provocada –fundamentalmente– por la acción de la radiación ultravioleta, la biodegradación y la bioacumulación. En una consideración sumaria de la bibliografía disponible puede concluirse que la biodegradación del LAS es, con diferencia, el principal mecanismo implicado en su desaparición en los sistemas litorales. Una consideración detenida de esta cuestión merece, sin embargo, que se tenga en cuenta la velocidad con que se produce en función de las condiciones fisicoquímicas del medio en los distintos compartimentos ambientales en los que tiene lugar la acumulación.



## OBJETIVOS

De una manera general, el objetivo de este trabajo de investigación fue profundizar en el conocimiento del comportamiento del LAS en los sistemas costeros y conocer las implicaciones ambientales de sus productos de biodegradación: los ácidos sulfofenilcarboxílicos (SPC).

Sobre el tensioactivo original –el LAS- se han publicado en los últimos años notables artículos, que han aumentado la base de datos sobre los niveles existentes en los ecosistemas marinos afectados por vertidos residuales que lo contienen. No obstante, en la actualidad existen todavía muchas lagunas sobre los aspectos básicos que rigen su comportamiento ambiental. En el caso de los ácidos sulfofenilcarboxílicos la situación es sustancialmente distinta. No se dispone de patrones de muchos de ellos, se desconocen la mayoría de sus propiedades fisicoquímicas y son pocos los trabajos publicados en los que se ha abordado su detección y, aún menos, los que se han ocupado de su distribución en el medio y su persistencia.

Con estas consideraciones los objetivos concretos con los que se estableció el plan de trabajo de esta Tesis Doctoral fueron los siguientes:

1. Desarrollar una metodología para el análisis simultáneo de los distintos homólogos del LAS y de los ácidos sulfofenilcarboxílicos -procedentes de su biodegradación- en muestras de agua, sólidos en suspensión, sedimentos y agua intersticial de muestras de origen marino y estuárico.
2. Determinar las bases por las que se rigen el comportamiento ambiental del LAS y los SPC en el medio litoral: su dispersión, acumulación en los sedimentos y su persistencia.

La consecución de este objetivo implicaba considerar las siguientes cuestiones:

- 2.1. Caracterizar y comparar la adsorción de los distintos homólogos del LAS y de sus metabolitos de degradación de igual longitud de cadena, determinando el efecto de la temperatura en la adsorción, y en su caso, el valor de las funciones termodinámicas que rigen el proceso.
- 2.2. Conocer la persistencia de los ácidos sulfofenilcarboxílicos en el medio marino a través de ensayos de biodegradación realizados en el laboratorio, con objeto de sentar las bases que permitan establecer el mecanismo y la cinética de la biodegradación completa del LAS en este ecosistema.
3. Hacer una prospección de los niveles de LAS y SPC en los distintos compartimentos ambientales de una amplia selección de sistemas litorales de la península Ibérica, sujetos a condiciones ambientales diversas y en los que se producen vertidos con LAS de diferente cuantía.

• • •

En la redacción de esta memoria se ha optado por presentar los resultados obtenidos en capítulos diferentes según su temática. Así, en el **segundo capítulo** se discute el procedimiento analítico desarrollado para el análisis simultáneo de LAS y SPC. En el **tercer capítulo** se tratan los aspectos relacionados con la cinética de degradación del LAS y algunas de las variables que afectan a este proceso. La caracterización de la adsorción del LAS y sus intermedios de degradación se desarrolla en el **capítulo cuarto**. Y por último, en el **quinto capítulo** se describe la distribución del LAS y los SPC en distintos compartimentos y sistemas litorales.

Cada uno de estos capítulos va precedido de una introducción en la que se ha pretendido plasmar, de manera específica, el grado de conocimiento que se tiene en la actualidad sobre las cuestiones abordadas. Para facilitar su consulta, se ha incluido la bibliografía citada al final de cada capítulo.

La memoria incluye también un glosario de acrónimos/símbolos y abreviaturas, y un anexo en el que se han recogido las publicaciones realizadas hasta la fecha.

## Bibliografía

- Amano, K., Fukushima, T., Inaba, K., Nakasugi, O. 1989. Adsorption of LAS with the suspended solids in natural aquatic systems. *Jap. J. Wat. Poll. Res.*, 12, 8:38-47.
- Berna, J.L., Cavalli, L. 1999. LAS:Linear Alkylbenzene Sulfonate. Facts & Figures. December 1999. European Councilon Studies on LAB-LAS, a CEFIC sector group.
- Cohen, L., Moreno, A., Berna, J. L. 1998. LAS magnesium salts-a contribution to mildness and performance. *Tenside Surfact. Det.*, 35, 4:265-269.
- Diario oficial de la Unión Europea, No. L 99, 11 de Abril de 1992.
- Diario oficial de la Unión Europea, No L217/14, 13 de septiembre de 1995.
- Dobson, B.C. 2000. The oleochemicals opportunity. Proceedings of 5<sup>th</sup> World Surfactant Congress, Florencia, Abril-Mayo 2000, 1: 39-55.
- Folke, J., Landner, L. 2000. Risk assessment of LAS in sewage sludge and soil. Based on current literature. AF-MiljöforskarGruppen. Report to Kemist-Tekniska Leverantörförbundet (KTF), Stockholm.
- Haigh, S.D. 1996. A review of the interaction of surfactants with organic contaminants in soil. *Sci. Total Environ.*, 185:161-170.
- Holmstrup, M., Krogh, P.H. 1999. Effects of LAS on soil fauna. National Environmental Research Institute (NERI), Dept. of Terrestrial Ecology. LAS Risk Assessment for Sludge-Amended Soils, 19-20 April 1999, SPT Workshop in Coordination with the DEPA, Copenhagen, Denmark.
- Smith, D. L. 1997. Impact of composition on the performance of sodium linear alkylbenzenesulfonate (NaLAS) . *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 74, 7:837-845.
- Terzic, S., Hrsak, D., Ahel, M. 1992. Enrichment and isolation of LAS degrading bacteria from estuarine and coastal waters. *Marine Poll. Bull.*, 24, 4:199-204.
- Verge, C., Moreno, A., Bravo, J., Berna, J.L. 2001. Influence of water hardness on the bioavailability and toxicity of linear alkylbenzene (LAS). *Chemosphere* (en prensa).
- West, C.C., Harwell, J.H. 1992. Surfactants and subsurface remediation. *Environ. Sci. Technol.*, 26, 2:2324-2330.

**2. ANÁLISIS DEL ALQUILBENCENO LINEAL SULFONATO (LAS) Y SUS INTERMEDIOS DE DEGRADACIÓN(ÁCIDOS ULFOFENILCARBOXÍLICOS) EN MUESTRAS DE ORIGEN MARINO Y ESTUÁRICO**

## 2.1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS

La importante innovación industrial que supuso la sustitución del tetrapropileno sulfonato (TBS) por el alquilbenceno sulfonato (LAS) a mediados de los 60, afectó a los planteamientos existentes sobre la determinación de la concentración de tensioactivos aniónicos en muestras ambientales. Se hizo, por tanto, necesario disponer de un método analítico capaz de determinar no sólo la cantidad de materia tensioactiva aniónica presente en una muestra ambiental, sino también de discriminar qué parte de ella correspondía al TBS y cual al LAS.

### 2.1.1. Separación y detección de LAS y SPC

Como consecuencia de la reducida especificidad de los métodos colorimétricos, (los resultados se expresan, de una manera operativa, como la concentración de sustancias activas al azul de metileno) comienzan a aplicarse las técnicas cromatográficas a la determinación específica e individual de los distintos tensioactivos aniónicos. En este sentido, tanto la cromatografía de gases como la de líquidos han permitido la determinación cuantitativa de homólogos, isómeros posicionales e intermedios de degradación de los principales tensioactivos. Su ventaja fundamental radica en una gran capacidad de separación e identificación.

Los tensioactivos aniónicos son especies no volátiles e iónicas y por tanto, deben ser derivatizados antes de su determinación por cromatografía de gases. A pesar de ello, diversos autores han identificado y cuantificado tensioactivos aniónicos usando técnicas basadas en la cromatografía de gases previa formación de un derivado volátil (Stephanou y Giger, 1982; Giger *et al.*, 1984; McEvoy y Giger, 1986; Trehy *et al.*, 1990, Fernández *et al.*, 1991; Field *et al.*, 1992a; Field *et al.*, 1994).

Por el contrario la cromatografía de líquidos permite el análisis directo, sin necesidad de recurrir a la derivatización ó desulfonación del tensioactivo. Dicha técnica comenzó a aplicarse para el análisis de LAS desde mediados de los años 70, siendo la cromatografía de líquidos en fase reversa la más utilizada. La elección de la fase móvil (polar) y de la fase estacionaria (columna analítica no polar) depende, en gran medida, de si el objetivo del trabajo es la cuantificación de la concentración total de alquilbenceno

lineal sulfonato, o bien la determinación específica del contenido en cada uno de los homólogos e isómeros del mismo.

Para conocer la concentración total de LAS de forma rutinaria es conveniente disponer de un método rápido, sensible y específico. La mayor sensibilidad se obtiene cuando todos los isómeros posicionales de cada homólogo de LAS eluyen en un solo pico, ya que aumenta la cantidad total de analito presente en la célula de flujo del detector. Si tenemos en cuenta las bajas concentraciones, del orden de partes por billón, encontradas en muestras ambientales este procedimiento es especialmente útil. Cavalli y Lazzarin (1987) trabajaron para conseguir este propósito en condiciones isocráticas usando como fase móvil metanol/agua (80/20) con perclorato sódico (0.1M) y como fase estacionaria una columna analítica de octadecilsílice ( $C_{18}$ ). La adición del disolvente orgánico al agua modifica la polaridad del eluyente obteniéndose una buena separación en un corto espacio de tiempo. Esta separación mejora en presencia de sal ( $NaClO_4$ ), ya que aumenta la capacidad de retención de los distintos homólogos. Sin embargo estos autores obtienen dos picos por cada homólogo de LAS, ya que al usar una columna  $C_{18}$  el tiempo de retención aumenta 2.5 veces con respecto al obtenido para una columna de octilsílice. En este sentido, con una columna  $C_8$  y trabajando en régimen isocrático todos los isómeros de cada homólogo eluyen en un sólo pico (Castles *et al.*, 1989; Fujita *et al.*, 1990; Di Corcia *et al.*, 1991; Fujita, 1993; González-Mazo y Gómez-Parra, 1996). Resultados similares se han obtenido usando  $C_{18}$  y eluyentes menos polares (Holt *et al.*, 1989; Matthijs y Stalmans 1993).

Para caracterizar la composición específica del LAS diferenciando homólogos e isómeros es absolutamente necesario el uso de una columna cromatográfica  $C_{18}$  (Marcomini *et al.*, 1989), así como un régimen de elución en gradiente. La fase móvil utilizada por estos autores estaba formada por acetonitrilo y agua-acetonitrilo (75:25) conteniendo  $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $NaClO_4$ . También se han utilizado otros tipos de fase estacionaria como el poliestireno-divinilbenceno, que presenta un mayor poder de retención y capacidad de separación, pero incrementa en exceso el tiempo de análisis (Sanagi *et al.*, 1996).

Siguiendo este planteamiento Terzic *et al.* (1992) y Terzic y Ahel (1994) desarrollaron dos métodos para obtener objetivos diferentes. Para determinar la concentración de los homólogos individuales usan una columna cromatográfica  $C_8$  y como fase móvil una mezcla de acetonitrilo, agua y 2-propanol (38:57:5) conteniendo

0.02 mol·L<sup>-1</sup> de NaClO<sub>4</sub> en condiciones isocráticas. Para la separación de los isómeros del LAS usan una columna larga (250 mm x 4mm d.i.) de C<sub>18</sub>, con un tamaño de partícula de 3 µm, y aplican un gradiente de elución consistente en dos mezclas diferentes de acetonitrilo y agua (A= 33:67 y B= 80:20), con 10 g L<sup>-1</sup> de perclorato sódico.

La cromatografía de líquidos fue utilizada también para discriminar entre los alquilbenceno sulfonatos ramificados (BAS) y los lineales (LAS). La elución de los componentes de mayor peso molecular de BAS se produce en un pico ancho con el mismo tiempo de retención del C<sub>11</sub>LAS (Tong y Tan, 1993). También fue realizada la determinación simultánea de ambos compuestos en sedimentos, usando en este caso la cromatografía de gases con espectrometría de masas (Reiser *et al.*, 1997).

La detección por fluorescencia (FL) es la más sensible y específica para el LAS (Kikuchi *et al.*, 1986, Inaba y Amano, 1988). Estos últimos autores encontraron grandes interferencias utilizando minicolumnas de octadecilsílice como etapa de purificación y detección ultravioleta. Sin embargo la detección por fluorescencia se ha mostrado como una técnica muy específica para la determinación de LAS en múltiples matrices ambientales (Matthijs y De Henau, 1987; Castles *et al.*, 1989; Di Corcia *et al.*, 1991; González-Mazo y Gómez-Parra, 1996). Recientemente nuevas aplicaciones de ionización en la espectrometría de masas, como la de bombardeo rápido de iones, permiten un análisis de menor duración que otras técnicas de detección acopladas a cromatógrafos. Ventura *et al.*, (1992) han aplicado esta técnica para identificar los tensioactivos presentes en muestras de agua, incluido el LAS. Por último, se está aplicando la electroforesis capilar con detección de ultravioleta, pero es una técnica en fase de desarrollo, con menor resolución y sensibilidad que la cromatografía (Vogt y Heining, 1998; Heining *et al.*, 1998; Riu *et al.*, 2000).

Un estudio completo del comportamiento ambiental de los tensioactivos aniónicos debe incluir la identificación y cuantificación de sus intermedios de degradación, los ácidos sulfofenilcarboxílicos (SPC). La primera separación de los SPC fue obtenida por Swisher *et al.*, (1978) empleando la cromatografía de par iónico en fase reversa. La fase móvil estaba constituida por tampones acuosos que contienen una baja concentración del "contraión". La principal limitación de esta técnica fue la carencia de patrones comerciales de estos compuestos. Un año más tarde Taylor y Nickless (1979) consiguieron separar una mezcla de patrones de SPC (C<sub>3</sub>, C<sub>6</sub>, C<sub>8</sub>, C<sub>10</sub>), sintetizados en el laboratorio, empleando una fase móvil que contenía iones cetiltrimetilamonio. Sin embargo, la

identificación de los intermedios de degradación procedentes de una muestra de LAS parcialmente degradado no fue buena, e incluso usando un detector de fluorescencia no se obtuvo ninguna mejora (Linder y Allen, 1982). Posteriormente Cavalli *et al.*, (1996) empleando como fase móvil (A:agua y B: acetonitrilo/agua 80/20 con 0.005M de hidrogenosulfato de tetraetilamonio, TEAHS, como par iónico) en régimen de gradiente y una fase estacionaria C<sub>18</sub> obtuvieron una buena separación entre LAS y SPC.

Marcomini *et al.*, (1991) aplicaron la técnica de cromatografía de efecto "ion-supresion", basada en la protonación de los grupos carboxílicos de los SPC y consiguieron la elución individual de los mismos en un lodo primario de una planta de tratamiento de aguas residuales. Sin embargo, la cuantificación de los compuestos para los que no se disponía de patrones fue realizada considerando que las señales detectadas por fluorescencia antes de la elución del LAS correspondían solamente a SPC.

Los esfuerzos en los últimos años se han centrado en la determinación y cuantificación específica del LAS y sus productos de degradación de forma simultánea en muestras ambientales, utilizando tanto cromatografía líquida como de gases. La identificación de los ácidos sulfofenilcarboxílicos (SPC) se está realizando a partir de patrones disponibles (Field *et al.*, 1992c; Sarrazin *et al.*, 1997,1999; González-Mazo *et al.*, 1997), o en su defecto utilizando la detección por espectrometría de masas (González-Mazo *et al.*,1997; Ding *et al.*,1998; Di Corcia *et al.*, 1999a; Knepper y Kruse, 2000). La diferencia fundamental entre ambos procedimientos de detección radica en que las sales comúnmente utilizadas en la fase móvil con detección de fluorescencia o ultravioleta (NaClO<sub>4</sub>, TEAHS,...), han de ser sustituidas por otros compuestos cuando se utiliza la detección por espectrometría de masas, ya que introducen interferencias y obstruyen el capilar del detector (González-Mazo *et al.*, 1997).

En lo que respecta a la aplicación de la espectrometría de masas a la determinación de SPC, cabe destacar la identificación por vez primera y de forma inequívoca de los SPC de cadena larga (C9-C13) en el medio marino (González-Mazo *et al.*, 1997), usando un régimen de gradiente con AcN/H<sub>2</sub>O 80/20 y H<sub>2</sub>O, ambas disoluciones con trietilamina (5mM) y de ácido acético(5mM). La cuantificación de los SPC de los que no se disponía de patrones, se realizó asumiendo una misma respuesta del detector que los de longitud de cadena similar.



La determinación de LAS y sus posibles intermedios de degradación de bajo peso molecular ( $C < 8$ ), tanto sulfonados como no sulfonados, ha sido realizada por cromatografía en fase reversa en régimen de gradiente (A: acetonitrilo y tampón de fosfato de pH=2.2) y detección por ultravioleta (Sarrazin *et al.*, 1997; 1999). En las condiciones cromatográficas utilizadas, el tiempo de retención de los ácidos sulfofenilcarboxílicos y de los compuestos no sulfonados aumenta proporcionalmente con la longitud de cadena. El orden de elución obtenido para compuestos con un mismo número de átomos de carbono en la cadena carboxílica es el siguiente: ácidos sulfofenilcarboxílicos, ácidos hidroxifenilcarboxílicos y por último, los ácidos fenilcarboxílicos.

Muy recientemente la cromatografía de líquidos también ha sido utilizada para la determinación de los compuestos generados durante el proceso de producción del LAS (dialquiltetralinas sulfonadas, DATS, y alquilbenceno sulfonatos con un metilo ramificado, iso-LAS). Las DATS han sido detectadas en plantas depuradoras, ríos y aguas subterráneas (Trehly *et al.*, 1990; Field *et al.*, 1992b; Trehly *et al.*, 1996), aunque en España -debido al método de producción empleado (Smith, 1997)- su proporción en el LAS comercial es inferior al 1%. El LAS y los DATS, así como sus intermedios de degradación, se han determinado por cromatografía líquida utilizando detección de ultravioleta (Nielsen *et al.*, 1997) o bien con cromatografía de gases y espectrometría de masas (Kolbener *et al.*, 1996). Recientemente Di Corcia *et al.*, (1999a,b) han desarrollado un método para analizar LAS, DATS, iso-LAS y sus intermedios de degradación (SPC, SPC con un metilo ramificado y los correspondientes a los DATS) utilizando HPLC y espectrometría de masas con interfase de electrospray (ES). La separación se desarrolla en régimen de gradiente utilizando una fase estacionaria tipo  $C_{18}$ , y como fase móvil una disolución acetonitrilo-agua con acetato amónico como par iónico ( $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ). Knepper y Kruse (2000) han aplicado esta misma técnica HPLC/ES/MS para la determinación del LAS y los SPC monocarboxílicos, usando acetato de tetraetilamonio como par iónico (A: agua B: AcN/H<sub>2</sub>O 80/20, ambas disoluciones con 5mM acetato de tetraetilamonio).

El estado actual de la técnica para el análisis de los SPC ha permitido la cuantificación de un número reducido de intermedios (Field *et al.*, 1992c), fundamentalmente los SPC de cadena más corta (Sarrazin *et al.*, 1997,1999), y no de forma simultánea al LAS. Los datos del resto de intermedios son una aproximación cualitativa asumiendo que presentan una respuesta similar a la de los patrones

disponibles (González-Mazo *et al.*, 1997; Ding *et al.*, 1998; Di Corcia *et al.*, 1999a; Knepper y Kruse, 2000;).

### **2.1.2. Extracción, aislamiento y concentración de LAS y SPC**

#### **A. Tratamiento de muestras sólidas**

Para el caso de muestras sólidas (sedimentos, lodos, biota,...) es necesario realizar una etapa previa de extracción del analito. Existen pocos métodos disponibles para este fin, siendo la extracción Soxhlet el más utilizado para la mayoría de los compuestos orgánicos. Las recuperaciones obtenidas con esta técnica para el LAS en sedimentos marinos son superiores al 90% (González-Mazo *et al.*, 1998).

Recientemente se están desarrollando nuevas técnicas como la dispersión en matriz sólida (MSD) que consiste en una extracción en fase sólida sobre una mezcla de muestra (biota, sedimento) y octadecilsílice (Tolls *et al.*, 1999). Otras aplicaciones recientes son la extracción supercrítica y la extracción acelerada de disolvente (Hawthorne *et al.*, 1991, Field *et al.*, 1992a; Kreisselmeier y Durbeck, 1997), que permiten la reducción de los volúmenes de disolventes orgánicos a emplear y el tiempo necesario para la extracción. Con la extracción con fluido supercrítico, Kreisselmeier y Durbeck (1997) obtuvieron recuperaciones para los distintos homólogos del LAS superiores al 80% en sedimento. Esta técnica está aceptada por la EPA (Agencia de Protección Ambiental americana) para compuestos orgánicos, pero todavía no para tensioactivos. Según nuestro conocimiento no existen estudios de recuperación de SPC en sedimentos marinos.

#### **B. Extracción en fase sólida del LAS y los SPC**

El principal inconveniente de trabajar con muestras ambientales es su compleja composición -especialmente las de aguas residuales, lodos de depuradora y muestras marinas (sistemas litorales)-, así como las bajas concentraciones de tensioactivos que generalmente contienen. Esto ha llevado a la mayoría de los investigadores a realizar de forma previa al análisis una etapa de concentración y purificación de los analitos.

Este proceso ha sido tradicionalmente llevado a cabo por extracción líquido-líquido. La extracción líquido-líquido de par iónico con el catión azul de metileno fue empleada para la extracción de LAS (Hon-nami y Hanya, 1980; Waters y Garrigan, 1983). Matthijs y Stalmans (1993) y Terzic *et al.*, (1992) han desarrollado un procedimiento basado en el trabajo original de Wickbold (1971) para la extracción con disolvente del LAS contenido en muestras de agua de mar. Para el tratamiento de muestras más complejas, que presentan gran cantidad de interferencias y necesitan niveles de detección muy bajos, comenzaron a desarrollarse técnicas de preconcentración por extracción sólido-líquido con varios materiales adsorbentes, tales como la resina XAD (Taylor y Nickless, 1979), la resina de intercambio aniónico (Saito *et al.*, 1982) o los cartuchos "Sep Pak" C<sub>18</sub> (Trattles, 1980).

La naturaleza hidrófoba de la cadena hidrocarbonada del LAS consolidó la utilización de minicolumnas de tipo hidrófobo (C<sub>8</sub>, C<sub>18</sub>, C<sub>2</sub>), o más recientemente las de poliestireno-divinilbenceno, que interaccionan de forma no polar con el grupo alquílico favoreciendo su retención y permitiendo la elución de otras sustancias interferentes. Las fases C<sub>18</sub> presentan una alta capacidad de retención (500µg de LAS para un cartucho de 3 mL, Fujita *et al.*, 1990), y con una única minicolumna pueden ser tratados dos litros de agua o el extracto orgánico de 20g de sedimento (Kikuchi *et al.*, 1986). Esta fase ha sido ampliamente utilizada en el tratamiento de muestras ambientales tanto en cartuchos (Prats *et al.*, 1993; González-Mazo *et al.*, 1997,1998) como en discos de extracción (Yamini *et al.*, 1994), aunque retienen también otros compuestos orgánicos que interfieren en el análisis, disminuyendo la sensibilidad y, en algunos casos, enmascarando la sustancia a analizar.

Para muestras complejas es conveniente utilizar otra etapa de extracción a modo de lavado. Teniendo en cuenta el carácter aniónico del LAS, se ha utilizado la minicolumna de intercambio aniónico fuerte, SAX. En los últimos años se han empleado también minicolumnas que actúan como fase reversa y de intercambio aniónico a la vez, como la de carbono negro grafitizado ("graphitized carbon black"). Las aplicaciones han sido muy diversas según las distintas matrices estudiadas. Una selección de ellas se muestra en la tabla 2.1.

**Tabla 2.1. Diferentes métodos de extracción en fase sólida utilizados para el aislamiento y purificación del LAS.**

EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA			
1ª etapa	2ª etapa	Muestra	Referencia
C <sub>18</sub>		Agua de mar, sedimento y peces	Kikuchi <i>et al.</i> , 1986
SAX	C <sub>8</sub>	Lodos, suelo y sedimentos río	De Henau <i>et al.</i> , 1986
C <sub>2</sub>	SAX	Aguas residuales y de río	Castles <i>et al.</i> , 1989
C <sub>8</sub>		Agua y sedimento de río	Trehy <i>et al.</i> , 1990
CGB		Agua de río y aguas residuales	Di Corcia <i>et al.</i> , 1991; 1993; 1994
Resinas intercambio catiónico/aniónico	Resina XAD-8	Aguas subterráneas	Field <i>et al.</i> , 1992c
C <sub>8</sub>	SAX+ C <sub>8</sub>	Agua de mar	Matthijs y Stalmans, 1996
C <sub>18</sub>	SAX	Agua y sedimento marino	González-Mazo y Gómez-Parra, 1996
SAX		Sedimento de lago	Reiser <i>et al.</i> , 1997

González-Mazo y Gómez-Parra (1996) han propuesto un método de purificación y concentración por extracción en fase sólida, que muestra buena selectividad para el LAS y un alto porcentaje de recuperación para un amplio intervalo de concentraciones. La recuperación del LAS en la etapa de extracción en fase sólida es del 96.5%±1.5%, ligeramente superior a la obtenida por Kikuchi *et al.* (1986) y similar a la propuesta por De Henau *et al.*, (1986). Sin embargo la recuperación obtenida para los SPC de cadena corta (C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>) fue sólo del 20 %. En opinión de Altenbach y Giger (1995), la naturaleza polar de estos intermedios provoca su pérdida durante el tratamiento.

Recientemente las investigaciones se han dirigido hacia el desarrollo de un método de concentración y purificación para el LAS y sus intermedios de degradación de forma simultánea. Teniendo en cuenta el amplio intervalo de polaridad, se han desarrollado métodos de extracción secuencial usando resinas XAD-8 (Field *et al.*,

1992c), octadecilsílice (Marcomini *et al.*, 1993) y carbono negro grafitizado (Di Corcia *et al.*, 1994). Field *et al.*, (1992c) han determinado LAS, DATS, alquilfenoles etoxilados y sus intermedios de degradación usando diferentes eluyentes y variando el pH. Concretamente la separación del LAS y los SPC de la fracción final obtenida se consigue eluyendo los SPC con una disolución básica (pH=12, 0.01N NaCl), ya que los homólogos de LAS permanecen adsorbidos sobre la resina en estas condiciones. Di Corcia *et al.*, (1994) han ajustado la muestra (10-15mL) a un pH ácido (pH=3) con HCl, para favorecer la retención de los SPC dicarboxílicos, y posteriormente eluyen secuencialmente el material retenido con tres fracciones de mayor a menor polaridad (disolución de composición variable de metanol y cloruro de metileno). El límite de detección obtenido con estos métodos es de  $1\text{-}20\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  para muestras de 0.1 a 1L, que es un valor aceptable desde el punto de vista medioambiental. Lamentablemente estos métodos no se han contrastado para el conjunto de los intermedios de degradación, y la elución fraccionada del LAS y los SPC conduce a la realización de diferentes análisis, y se hace un proceso en general tedioso, que al diversificarse multiplica también las posibles fuentes de error y contaminación.

Crescenzi *et al.*, (1996) han obtenido elevadas recuperaciones para C<sub>3</sub>,C<sub>4</sub> y C<sub>5</sub>SPC usando el carbono negro grafitizado y grandes volúmenes de muestra (0.5-4L). Este método ha sido aplicado únicamente a SPC de bajo peso molecular en agua dulce, obteniendo un límite de detección en inyección de 0.4  $\mu\text{g}$ . Sarrazin *et al.*, (1997, 1999) aumentan la fuerza iónica del medio y ajustan el pH de la disolución a 1.5 para favorecer la retención de los compuestos más polares. Aunque las recuperaciones obtenidas son elevadas, el método ha sido evaluado para concentraciones superiores a  $400\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de cada compuesto, con un límite de detección superior a  $20\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (60mL de muestra). Por tanto su aplicación a muestras ambientales es cuestionable, debido principalmente a dos razones fundamentales: i) no se ha contrastado su validez a concentraciones ambientalmente representativas y por tanto su aplicación se restringe a zonas muy contaminadas, y ii) para estos casos el uso de una sola minicolumna C<sub>18</sub>, no permite la eliminación de interferencias cuando la detección se realiza con ultravioleta (Inaba y Amano, 1988).

Recientemente se están desarrollando técnicas que reducen el volumen de muestra, como la microextracción en fase sólida. Este método consiste en utilizar adsorbentes de gran capacidad (fibras recubiertas de distintos grupos activos) que se ponen en contacto con la muestra (<10mL), que es posteriormente eluída. Sus elevados

límites de detección reducen su aplicación exclusivamente a plantas de tratamiento de aguas residuales o áreas muy contaminadas.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Desde un punto de vista analítico, el estado actual de los conocimientos conduce al desarrollo de un método de extracción, purificación y concentración que permita una cuantificación precisa del LAS y los SPC monocarboxílicos en los distintos compartimentos ambientales a los que tiene acceso, incluyendo aquellos de composición compleja (medio marino). En este capítulo se han planteado los siguientes objetivos:

- Optimizar la técnica de extracción Soxhlet para el análisis de LAS y SPC en sedimentos y sólidos en suspensión.
- Establecer un procedimiento de extracción en fase sólida que permita el aislamiento y concentración de LAS y SPC en muestras con un amplio intervalo de concentraciones y salinidades.
- Obtener las mejores condiciones cromatográficas para la separación y cuantificación simultánea de LAS y SPC por HPLC-FL de manera sensible y específica.

En la presente memoria de investigación se describe el método de separación y cuantificación desarrollado para la determinación simultánea de LAS y todos sus intermedios de degradación monocarboxílicos, basado en la cromatografía líquida en fase reversa con detección de fluorescencia. También se presenta el procedimiento utilizado para la extracción Soxhlet de los homólogos del LAS y del SPC de muestras sólidas, así como un método de concentración y purificación para el LAS y todos sus intermedios de degradación monocarboxílicos en muestras de matriz compleja: agua, agua intersticial y sedimento marino. El método ha sido evaluado para un amplio intervalo de concentraciones y salinidades. Las condiciones analíticas y los resultados se muestran a continuación en el presente capítulo, y parte de los cuales han sido publicados en *Journal of Chromatography A* y en *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*.

## 2.2. MATERIALES

### 2.2.1. Procedencia de los patrones de LAS y SPC. Composición y pureza

El LAS, como formulación comercial, y sus homólogos individuales han sido suministrados por Petroquímica Española S.A. El LAS comercial de índice activo 6.62 %, tiene una composición expresada en tanto por ciento en peso de 3.9, 37.4, 35.4, 23.1 y 0.2, para los homólogos C<sub>10</sub>, C<sub>11</sub>, C<sub>12</sub>, C<sub>13</sub> y C<sub>14</sub> respectivamente. Nuestro grupo de investigación dispone de una colección completa de patrones de SPC monocarboxílicos (C<sub>2</sub>-C<sub>13</sub>SPC), con la excepción del C<sub>7</sub>SPC. El C<sub>6</sub>SPC, C<sub>8</sub>SPC y C<sub>10</sub>SPC fueron donados por Dra. Jeniffer Field (Universidad de Oregón), y los SPC de cadena corta (C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>) fueron donados por Francesc Ventura (AGBAR). El resto de homólogos han sido sintetizados en la Universidad de Cádiz, por sulfonación cuando se disponía comercialmente del ácido fenilcarboxílico (Marcomini *et al.*, 1993), como es el caso del C<sub>11</sub>SPC, o por un procedimiento de síntesis. Este procedimiento consta de 5 etapas: en primer lugar el benzaldehído se sometió a una reacción de Wittig (Greenwald *et al.*, 1963), a continuación se convirtió en éster metílico, que fue reducido posteriormente e hidrolizado para obtener el ácido carboxílico correspondiente, y finalmente fue sulfonado. En todos los casos se obtuvo un rendimiento en la síntesis entre un 20 y un 30%, dependiendo de la longitud de la cadena, y la pureza obtenida fue superior al 90%. La estructura de los compuestos se confirmó por <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C RMN.

### 2.2.2. Reactivos y material utilizado

El metanol, calidad HPLC, fue suministrado por Scharlau (Barcelona) y el agua fue de calidad MilliQ (Millipore, Molsheim, Francia). El hidrogenosulfato de tetraetilamonio (TEAHS) fue suministrado por Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania), el cloruro sódico por Scharlau (Barcelona) y el dihidrógenofosfato de potasio por Panreac (Barcelona). Las minicolumnas de extracción en fase sólida (500 mg) fueron adquiridas de Merk (Lichrolut EN), Varian (Bond Elut C<sub>18</sub>) y Supelco (SAX). Los filtros Sterivac-GP10 (tamaño de poro 0.22 µm) fueron suministrados por Millipore (Molsheim, Francia) y los filtros tipo GF/F por Whatman (Maidstone, Inglaterra).

Las disoluciones patrón se prepararon en agua de mar adicionándole LAS y/o SPC hasta alcanzar la concentración deseada. El agua de mar utilizada, tomada a más

de 10 millas de la costa y, libre de tensioactivos y otros contaminantes como confirmó su análisis, fue filtrada por GF/F (Whatman) y posteriormente esterilizada filtrando por 0.22  $\mu\text{m}$  (Sterivac-GP10 de Millipore).

## 2.3. METODOLOGÍA DE ANÁLISIS

### 2.3.1. Análisis de LAS y SPC por HPLC

El equipo de análisis consta de un cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC HP 1050) equipado con un detector de fluorescencia ( $\lambda_{\text{ex}} = 225 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 295 \text{ nm}$ ). Los homólogos de LAS y SPC se separaron usando una columna Lichrosorb RP-8 de 250 mm de longitud y 4.6 mm de diámetro interno, con un tamaño de partícula de 10  $\mu\text{m}$  (Teknokroma), y el gradiente de elución mostrado en la tabla 2.2. El volumen de inyección para todas las muestras fue generalmente de unos 100  $\mu\text{L}$ , que se introdujo por medio de un inyector automático (HP 1100). La cuantificación de las muestras se realizó usando patrones externos (LAS y/o SPC en agua de mar), tratados siguiendo el mismo procedimiento analítico que las muestras.

**Tabla 2.2. Régimen de gradiente empleado para la separación de los homólogos de LAS y SPC. Flujo = 1  $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ . A: MeOH/H<sub>2</sub>O (80/20) +1.25 mM de hidrogensulfato de tetraetilamonio. B: H<sub>2</sub>O.**

Tiempo (min)	A(%)	B(%)
0	10	90
5	36	64
9	50	50
16	60	40
20	67	33
35	70	30
45	90	10
51	100	0
55	100	0
60	10	90



El gradiente de elución utilizado está basado en métodos descritos anteriormente (Cavalli et al 1996; González-Mazo et al., 1997), pero presenta importantes modificaciones (emplea metanol en lugar de acetonitrilo, disminuye la concentración de hidrogenosulfato de tetraetilamonio y cambia las proporciones de los eluyentes).

En los casos en los que ha sido necesario validar la asignación de los picos obtenida con el procedimiento anterior se ha aplicado la cromatografía líquida con espectrometría de masas (MS). Esta técnica ha sido especialmente útil para la determinación inequívoca del C<sub>7</sub>SPC del que no se disponía de un patrón, y corroborar la asignación del resto de los intermedios de degradación, especialmente en muestras reales y en los ensayos de biodegradación. Estos análisis se han realizado utilizando el equipo HPLC/MS del Servicio Central de Ciencia y Tecnología de la Universidad de Cádiz, y las condiciones aplicadas son las propuestas por González-Mazo et al., (1997). Este método consiste en un régimen de separación en gradiente con una disolución de agua (A) y AcN/H<sub>2</sub>O (80/20) (B), ambas con 5mM de trietilamina y 5mM de ácido acético, y una columna C<sub>18</sub> Hypersil 250×2mm (5µm de tamaño de partícula) como fase estacionaria. Se ha aplicado un flujo de 0.1 mL·min<sup>-1</sup>, y un gradiente prácticamente lineal desde 5%A+95%B a 100%A en 40 minutos, manteniendo esta proporción hasta los 65 minutos del análisis.

### 2.3.2. Pretratamiento de las muestras sólidas

La técnica de extracción Soxhlet que presenta elevadas recuperaciones para el LAS (González-Mazo et al., 1998) ha sido utilizada para la extracción simultánea de LAS y SPC de muestras sólidas. Las recuperaciones se determinaron dopando sedimentos marinos con homólogos de LAS (C<sub>10</sub>-C<sub>14</sub>) y SPC (C<sub>4</sub>, C<sub>8</sub> y C<sub>11</sub>). Se realizaron tres experimentos a distintas concentraciones: A) 50 µg·Kg<sup>-1</sup> SPC + 50 µg·Kg<sup>-1</sup> LAS; B) 200 µg·Kg<sup>-1</sup> SPC + 5 µg·g<sup>-1</sup> LAS y C) 500 µg·kg<sup>-1</sup> SPC + 25 µg·g<sup>-1</sup> LAS. Las diferencias entre las concentraciones de LAS y SPC obedecen a la menor concentración de SPC que usualmente se detecta en sedimento. En los tres casos la mezcla se homogeneizó y se dejó secar en la estufa a 50°C durante 72 horas. Kreisselmeier y Durbeck (1997) han demostrado que transcurrido este tiempo se favorece la interacción del compuesto con el sedimento, simulando las condiciones reales en las que estos compuestos se incorporan al mismo.

Alrededor de unos 10 gramos de sedimento seco se colocaron en cartuchos de extracción Soxhlet, previamente lavados con metanol(3h). La extracción se realizó con 60 mL de metanol durante 12 horas. Los extractos metanólicos se llevaron a sequedad con un rotavapor y el residuo se redisolvió en 200 mL de agua tibia (50-55°C) con la ayuda de un baño de ultrasonidos. Los extractos acuosos finales se sometieron al tratamiento de extracción en fase sólida, que se describe en el siguiente apartado de la memoria. Este ensayo se realizó por triplicado.

### **2.3.3. Extracción en fase sólida**

Como ha sido señalado el método extracción en fase sólida propuesto por González-Mazo y Gómez-Parra (1996) presenta buenas recuperaciones para el LAS, pero no para los SPC de cadena corta. Con el objetivo de detectar en que etapa del tratamiento se pierden los SPC, se optó por analizar todas las fracciones obtenidas (A, B, C, F) según se muestra en el esquema del procedimiento de la figura 2.1. Las fracciones “A” y “B” se neutralizaron con NaOH y se pasaron a continuación por una minicolumna de intercambio aniónico (SAX). El resto fueron analizadas directamente por HPLC.

Diferentes variables que afectan la eficiencia de la extracción, tales como el tipo de minicolumna (C<sub>18</sub>, Bond Elut C<sub>18</sub>, Lichrolut EN y SAX), pH, lavado, fuerza iónica y eluyentes utilizados, han sido estudiadas y optimizadas. La recuperación se ha calculado tratando distintas disoluciones de LAS y SPC en agua de mar, a concentraciones representativas desde el punto de vista ambiental (10, 50, 100, 200 y 450 µg/L de cada homólogo). El límite de detección y el volumen de ruptura del procedimiento también se han determinado. Para el cálculo de este último se prepararon disoluciones de agua oceánica (100, 250 y 500 mL) con la misma masa (5 µg) de cada uno de los homólogos disponibles. El proceso de extracción en fase sólida se ha desarrollado en una unidad Adsorbex SPU de 24 canales y todos los ensayos se realizaron por triplicado.

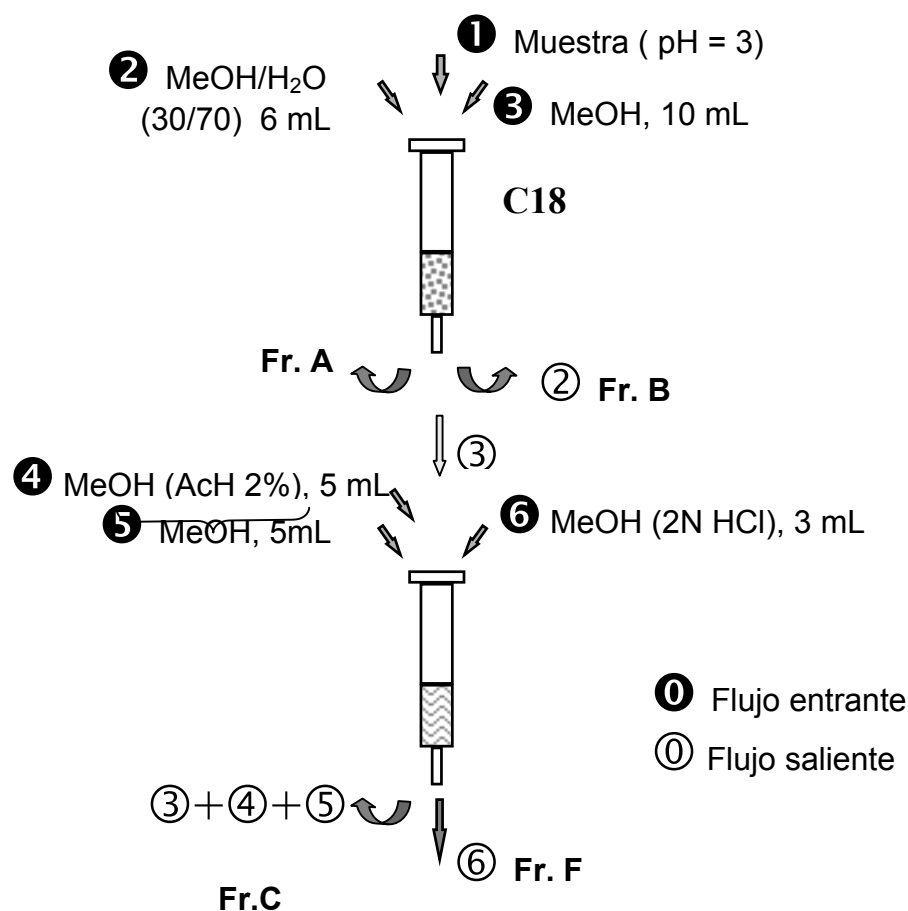
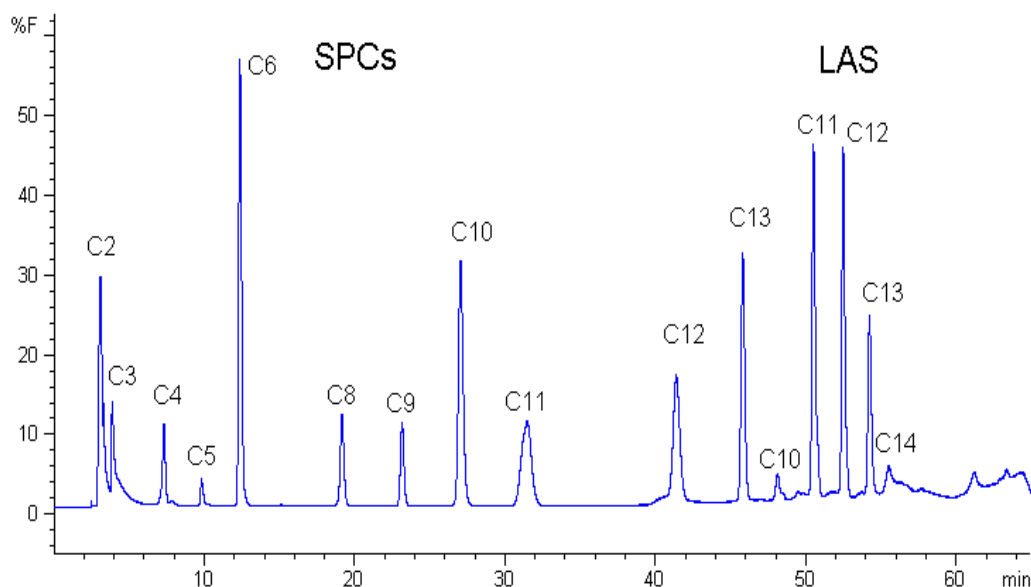


Figura 2.1. Esquema del tratamiento de extracción en fase sólida propuesto para el LAS en muestras de origen marino por González-Mazo y Gómez-Parra (1996), indicando las fracciones (Fr.) tomadas para su evaluación (A,B,C y F).

## 2.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 2.4.1. Separación y detección de LAS y SPC

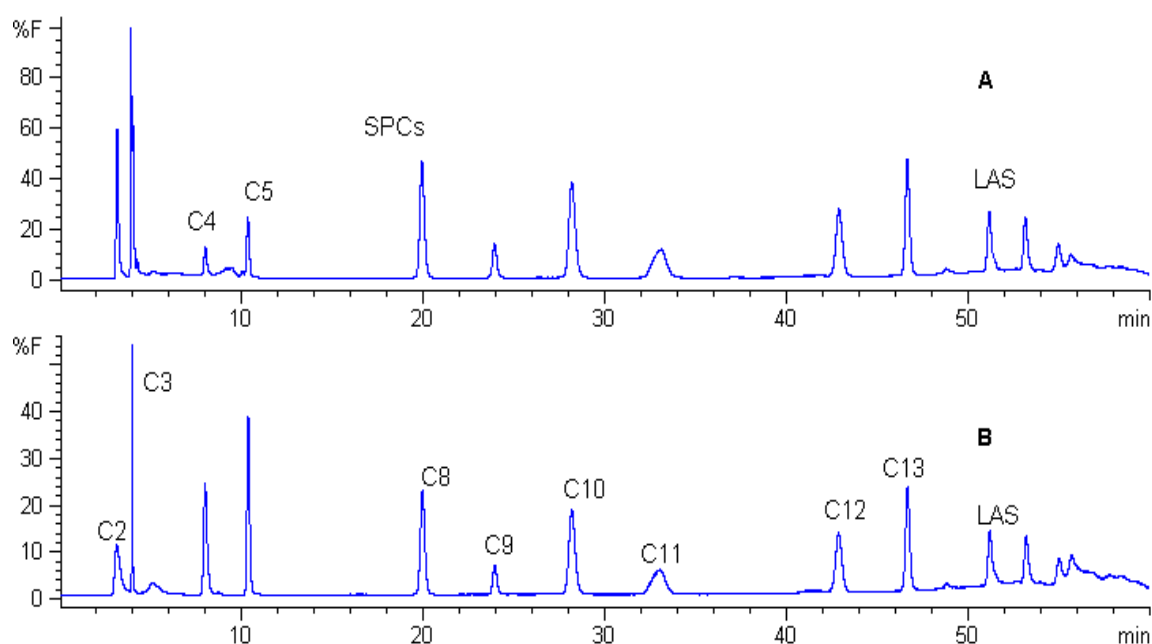
En la figura 2.2 se muestra el cromatograma obtenido para un patrón de LAS y SPC monocarboxílicos en agua de mar, siguiendo las condiciones analíticas descritas en el apartado 2.3.1 de este capítulo. El procedimiento seguido (columna  $C_8$  y régimen de gradiente mostrado en la tabla 2.2), permitió obtener cromatogramas con una eficiente separación de cada homólogo de LAS y SPC en un único pico, bajo el que eluyen la práctica totalidad de los isómeros posicionales.



**Figura 2.2. Cromatograma (HPLC/FL) de una mezcla de los patrones de LAS y SPC disponibles aplicando el gradiente propuesto (Tabla 2.1).**

Las muestras deben estar disueltas en la misma fase móvil que la del comienzo del gradiente (MeOH/H<sub>2</sub>O 8/92, Tabla 2.2). Sin embargo el residuo final procedente de la técnica de extracción en fase sólida descrita en el apartado 2.4.3, está disuelto en MeOH/H<sub>2</sub>O (80/20). Los cromatogramas obtenidos inyectando la muestra disuelta en esta proporción presentan una fracción de los SPC ( $C < 6$  átomos de carbono) que coeluyen bajo un solo pico, a un tiempo de retención de unos 4 minutos (Fig. 2.3A). Por tanto, el análisis de los SPC de menor peso molecular debe ser realizado diluyendo el extracto

procedente de la extracción en fase sólida con agua MilliQ, hasta alcanzar una mayor proporción de agua (Fig. 2.3B). Con objeto de realizar una menor dilución, el extracto seco (última etapa de la extracción en fase sólida) se intentó redissolver con una mayor proporción de agua (MeOH/H<sub>2</sub>O 50/50), pero las recuperaciones de LAS y SPC disminuyeron con respecto a las obtenidas con MeOH/H<sub>2</sub>O (80/20).



**Figura 2.3. Cromatogramas de patrones de LAS y SPC disueltos en MeOH/H<sub>2</sub>O (A) o diluyendo once veces de forma previa con agua (B).**

En la figura 2.4a se muestra un cromatograma obtenido por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y espectrometría de masas (MS), aplicando el régimen de gradiente descrito por González-Mazo *et al.*, (1997), correspondiente a un patrón de homólogos de SPC y LAS. Los cromatogramas para las relaciones masa/carga:  $m/z$  229 (C<sub>3</sub>SPC),  $m/z$  299 (C<sub>8</sub>SPC),  $m/z$  341 (C<sub>11</sub>SPC) y  $m/z$  369 (C<sub>13</sub>SPC) se muestran en la figura 2.4b, y corroboran la asignación de picos realizada.

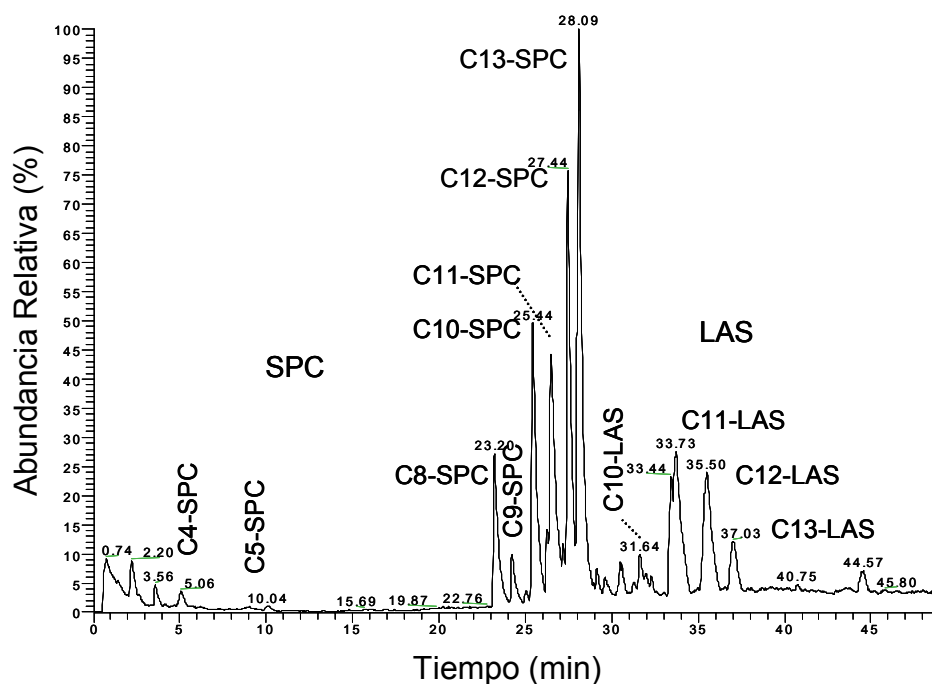


Figura 2.4a. Cromatograma obtenido por HPLC/MS con el régimen de gradiente y las condiciones de detección descritas por González-Mazo *et al.*, (1997) para un patrón de LAS y SPC.

## 2.4.2. Extracción Soxhlet

En la tabla 2.3 se muestran las recuperaciones obtenidas para los distintos homólogos de LAS y SPC en el proceso de extracción Soxhlet. Las recuperaciones para el LAS fueron mayores del 90% a concentraciones inferiores a  $25 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ . La recuperación disminuye hasta el 70% para las concentraciones más altas (experimento C), probablemente debido a la saturación de la minicolumna. En cualquier caso, las concentraciones utilizadas en este último experimento son mayores que las detectadas en sedimentos altamente contaminados.

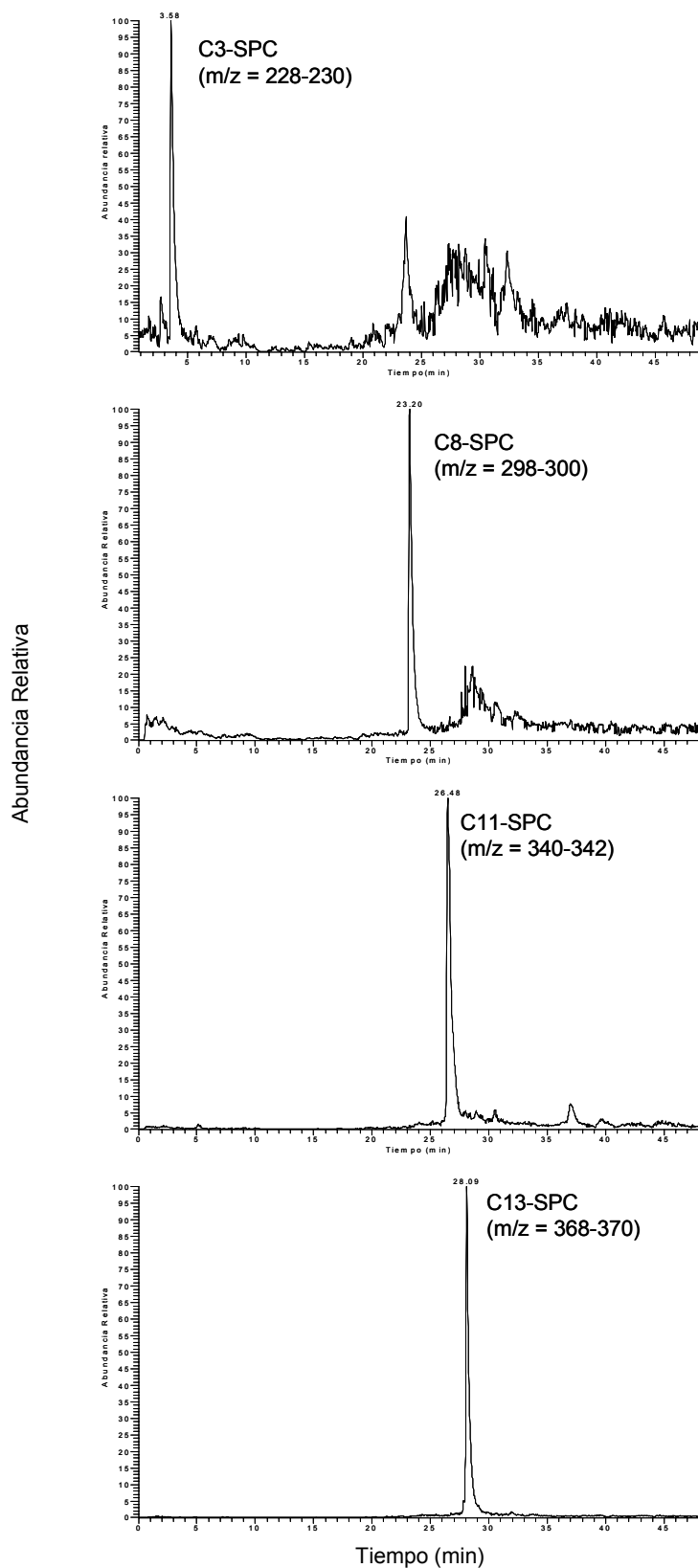


Figura 2.4b. Cromatograma obtenido por HPLC/MS para diversas relaciones de masa/carga :  $m/z$  229 ( $C_3$ SPC),  $m/z$  299 ( $C_8$ SPC),  $m/z$  341 ( $C_{11}$ SPC) y  $m/z$  369 ( $C_{13}$ SPC).

**Tabla 2.3. Recuperaciones y desviaciones estándar (n=3) de la extracción Soxhlet de LAS y SPC en muestras de sedimento dopadas. A: 50  $\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$  SPC + 50  $\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$  LAS; B: 200  $\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$  SPC + 5  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  LAS; C: 500  $\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$  SPC + 25  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  LAS.**

Compuesto	Recuperación(%) $\pm$ S.D.		
	A	B	C
C <sub>4</sub> SPC	56 $\pm$ 9	54 $\pm$ 11	48 $\pm$ 5
C <sub>8</sub> SPC	89 $\pm$ 6	75 $\pm$ 5	53 $\pm$ 9
C <sub>11</sub> SPC	105 $\pm$ 10	102 $\pm$ 8	95 $\pm$ 2
C <sub>10</sub> LAS	89 $\pm$ 7	85 $\pm$ 10	72 $\pm$ 4
C <sub>11</sub> LAS	91 $\pm$ 7	91 $\pm$ 9	75 $\pm$ 6
C <sub>12</sub> LAS	101 $\pm$ 5	90 $\pm$ 9	73 $\pm$ 5
C <sub>13</sub> LAS	90 $\pm$ 8	91 $\pm$ 11	74 $\pm$ 3
C <sub>14</sub> LAS	102 $\pm$ 5	95 $\pm$ 9	71 $\pm$ 4

Las recuperaciones para el C<sub>11</sub>SPC fueron superiores al 95% en todos los casos. Para el C<sub>8</sub>SPC, el porcentaje de recuperación obtenido fue mayor del 75% para los experimentos A y B, y para el C<sub>4</sub>SPC fue de alrededor del 50% en todos los casos. Di Corcia *et al.*,(1993) demostraron que cuando las muestras contienen cantidades importantes de ácidos fúlvicos, estos pueden tener un efecto considerable en la retención de los ácidos orgánicos de bajo peso molecular. Esta consideración y su menor polaridad podrían explicar el descenso en la recuperación obtenido para los SPC de cadena carboxílica más corta. A pesar de la menor recuperación, la reproducibilidad del proceso es buena como indican las pequeñas desviaciones estándar.

### 2.4.3. Extracción en fase sólida

Los porcentajes de cada uno de los SPC monocarboxílicos en las 4 fracciones analizadas (Fig. 2.2) correspondientes al método de González-Mazo *et al.*,(1996), se muestran en la tabla 2.4. Los ácidos sulfonilcarboxílicos de menos de 6 átomos de carbono en su cadena no fueron retenidos con este método, como demuestran los bajos porcentajes obtenidos al final del tratamiento (fracción F), ya que en general las



recuperaciones conseguidas con este tratamiento disminuyen con la polaridad de la molécula.

**Tabla 2.4. Porcentajes y desviaciones estándar (n= 3) de los SPC monocarboxílicos en las distintas fracciones obtenidas con el método propuesto por González-Mazo y Gómez-Parra (1996). A, B, C, F: fracciones mostradas en la figura 2.2.**

	Recuperación (%)							
	C <sub>2</sub> SPC	C <sub>3</sub> SPC	C <sub>4</sub> SPC	C <sub>5</sub> SPC	C <sub>6</sub> SPC	C <sub>8</sub> SPC	C <sub>10</sub> SPC	C <sub>11</sub> SPC
A	51 ± 9	48 ± 7	45 ± 8	25 ± 16	1 ± 1	n.c.	1 ± 1	n.c.
B	1 ± 1	5 ± 5	9 ± 5	30 ± 5	24 ± 7	n.c.	3 ± 5	n.c.
C	1 ± 1	3 ± 3	n.c.	n.c.	22 ± 16	2 ± 2	12 ± 14	n.c.
F	n.c.	n.c.	4 ± 3	10 ± 1	44 ± 4	68 ± 4	73 ± 4	72 ± 6

n.c.: detectado pero no cuantificable

Los SPC de bajo peso molecular mostraron una débil interacción hidrófoba con la minicolumna de octadecilsílice (C<sub>18</sub>), y no fueron retenidos en este adsorbente (fracción A). El lavado de la minicolumna C<sub>18</sub> con MeOH al 30% (fracción B) fue suficiente para eluir los compuestos más débilmente adsorbidos (el resto de los SPC con menos de 5 átomos de carbono en su cadena carboxílica y un 30% de los de 5 y 6 carbonos). Las pequeñas cantidades de SPC adsorbidas en la C<sub>18</sub>, tampoco fueron retenidas en la SAX (fracción C). Esto indicó que la recuperación en la SAX no fue adecuada, y por tanto, los porcentajes de SPC no retenidos en la C<sub>18</sub> (fracciones A y B), que se trataron posteriormente con una SAX, deben de ser mayores que los detectados. Esto explica que el porcentaje de recuperación para el tratamiento completo (A+B+C+F) no alcance el 100%. Por tanto es necesario modificar todas y cada una de las etapas del método original para obtener una buena recuperación para el conjunto de compuestos analizados.

#### **A. Minicolumna no polar (C<sub>18</sub>, Lichrolut EN, Bond Elut C<sub>18</sub>)**

##### *Influencia del lavado, pH y tipo de minicolumna*

Como se indicó anteriormente el lavado de la C<sub>18</sub> con disolvente con un 30% MeOH provocó la elución de los SPC de longitud de cadena intermedia. Para evitarlo se probaron tres procedimientos: a) sin lavar, b) lavar con 1 mL H<sub>2</sub>O (pH neutro) y c) lavar

con 1 mL H<sub>2</sub>O (pH=3, HCl). La elución de la C<sub>18</sub> se realizó con 10 mL de MeOH, y los extractos se evaporaron con corriente de N<sub>2</sub> a temperatura moderada (<45°C). El extracto seco se redisolvió en 1 mL de MeOH/H<sub>2</sub>O (80/20), y se analizó por cromatografía líquida según el método propuesto en el apartado 2.3.1 de esta memoria. Las recuperaciones (Tabla 2.5) de los SPC de cadena más corta (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>) aumentaron con respecto a las obtenidas en la fracción F de la tabla 2.4 pero fueron inferiores al 50%. Sin embargo las recuperaciones fueron muy bajas para los SPC de cadena larga y para los homólogos de LAS. La retención de estos compuestos sobre la C<sub>18</sub> se vio favorecida al no utilizar metanol en el lavado.

**Tabla 2.5. Porcentajes de recuperación y desviación estándar (n=3) para distintos lavados de la minicolumna C18: sin lavado, agua a pH neutro y agua a pH=3.**

Homólogo	Recuperación (%)		
	Sin lavado	H <sub>2</sub> O (pH neutro)	H <sub>2</sub> O (pH = 3)
C <sub>2</sub> SPC	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0
C <sub>3</sub> SPC	5 ± 7	8 ± 5	7 ± 3
C <sub>4</sub> SPC	16 ± 3	15 ± 2	20 ± 2
C <sub>5</sub> SPC	49 ± 2	47 ± 8	53 ± 3
C <sub>6</sub> SPC	47 ± 2	50 ± 8	49 ± 3
C <sub>8</sub> SPC	51 ± 3	60 ± 8	48 ± 4
C <sub>10</sub> SPC	42 ± 3	57 ± 6	33 ± 5
C <sub>11</sub> SPC	52 ± 6	69 ± 6	44 ± 4
C <sub>10</sub> LAS	14 ± 14	31 ± 18	20 ± 10
C <sub>11</sub> LAS	21 ± 4	33 ± 8	12 ± 1
C <sub>12</sub> LAS	21 ± 1	24 ± 6	15 ± 1
C <sub>13</sub> LAS	26 ± 2	27 ± 2	20 ± 1

La modificación del pH de la muestra tampoco produjo grandes mejoras. En un intento de favorecer la retención de los SPC sobre la C<sub>18</sub>, la muestra se ajustó a pH 2 con ácido clorhídrico. Las recuperaciones fueron del 6.8%±1.8%, 24.6%±7.8%, 26.5%±5.9% y

46.24±9.7% para los C<sub>2</sub>SPC, C<sub>3</sub>SPC, C<sub>4</sub>SPC y C<sub>5</sub>SPC, respectivamente, muy similares a las obtenidas a pH 3.

A continuación se calcularon las recuperaciones con minicolumnas Lichrolut EN y Bond Elut C<sub>18</sub>. La retención sobre Lichrolut EN está favorecida a pH ácidos. Los valores obtenidos a pH (2 y 3) mostraron recuperaciones de los homólogos del LAS y SPC de mayor peso molecular superiores al 90% y al 50% respectivamente. Sin embargo los SPCs más polares fueron eluidos y las recuperaciones obtenidas fueron inferiores a las obtenidas con la C<sub>18</sub>. Al utilizar la Bond Elut C<sub>18</sub> la recuperación para estos últimos fue superior en un 10% a la conseguida con la C<sub>18</sub>.

#### *Influencia de la fuerza iónica*

Para favorecer la interacción de los SPC de cadena corta con la minicolumna Bond Elut C<sub>18</sub>, se adicionó a la muestra (salinidad 36) cloruro sódico hasta una fuerza iónica de 5M y dihidrogenofosfato de potasio 0.05M. El pH se ajustó a 1.5 con ácido ortofosfórico. Dos procedimientos se utilizaron para la evaporación-reelución de las muestras, uno en frío (muestra en hielo) rediluyendo con acetona (Sarrazin *et al.*, 1997), y otro en caliente (<45°C) rediluyendo con MeOH/H<sub>2</sub>O(80/20).

Las recuperaciones obtenidas son superiores al 90% para C<sub>4</sub>SPC y C<sub>5</sub>SPC, de un 40% para el C<sub>3</sub>SPC e inferiores al 10% para el C<sub>2</sub>SPC (Tabla 2.6). No existen diferencias significativas entre ambos procedimientos y se optó por la evaporación con calefacción moderada debido a su menor duración.

**Tabla 2.6. Recuperaciones y desviaciones estándar (n=3) para los SPC de cadena corta obtenidos con Bond Elut C<sub>18</sub> aplicando diferentes condiciones de evaporación (en frío y en caliente).**

	Recuperación (%)±S.D.			
	C <sub>2</sub> SPC	C <sub>3</sub> SPC	C <sub>4</sub> SPC	C <sub>5</sub> SPC
Acetona+Hielo	5±0.2	39±1	90±1	94±1
MeOH+Calor	5±1	38±2	92±1	95±1

### B. Minicolumna de intercambio aniónico (SAX)

El procedimiento anterior aplicado a muestras de agua oceánica dopadas con LAS y SPC produjo cromatogramas libres de interferencias y de fácil cuantificación. Sin embargo, cuando se trataron muestras reales, particularmente de sistemas costeros, que constituyen una matriz compleja, los cromatogramas mostraban gran cantidad de interferencias y no fue posible una cuantificación precisa. En estos casos es necesario purificar la muestra eliminando los compuestos orgánicos no aniónicos. Esto fue descrito previamente usando una minicolumna de intercambio aniónico (SAX), para el análisis de LAS (González-Mazo y Gómez-Parra, 1996).

**Tabla 2.7. Porcentajes de recuperación y desviaciones estándar (n=3) en el tratamiento de la minicolumna SAX, con diversos lavados (A: H<sub>2</sub>O (pH neutro) B: AcH en agua al 2% C: lavado propuesto por González-Mazo y Gómez-Parra (1996) y evaporación con temperatura moderada.**

Homólogo	Recuperación (%)		
	A	B	C
C <sub>2</sub> SPC	82 ± 5	81 ± 6	57 ± 4
C <sub>3</sub> SPC	89 ± 6	85 ± 4	77 ± 13
C <sub>4</sub> SPC	95 ± 11	97 ± 5	101 ± 11
C <sub>5</sub> SPC	90 ± 10	96 ± 3	97 ± 15
C <sub>8</sub> SPC	88 ± 10	92 ± 4	73 ± 6
C <sub>9</sub> SPC	94 ± 20	94 ± 11	-
C <sub>10</sub> SPC	82 ± 28	85 ± 10	83 ± 23
C <sub>11</sub> SPC	64 ± 7	82 ± 15	87 ± 4
C <sub>12</sub> SPC	50 ± 12	75 ± 17	43 ± 47
C <sub>13</sub> SPC	33 ± 11	81 ± 8	56 ± 17
C <sub>10</sub> LAS	79 ± 21	85 ± 14	108 ± 30
C <sub>11</sub> LAS	65 ± 18	79 ± 23	46 ± 16
C <sub>12</sub> LAS	74 ± 10	85 ± 10	50 ± 13
C <sub>13</sub> LAS	103 ± 31	96 ± 30	105 ± 37

La pérdida de los SPC en esta minicolumna, comentada previamente, puede deberse al propio eluyente (10 mL MeOH) utilizado para el paso desde la C<sub>18</sub> a través de

la SAX. Este extracto metanólico se diluyó con H<sub>2</sub>O (90 mL) antes de pasar por la SAX. En este caso se compararon también tres lavados: A) 1 mL H<sub>2</sub>O (pH neutro), B) 1 mL H<sub>2</sub>O (2% AcH) y C) 5 mL MeOH (2% AcH) + 5 mL MeOH. Todas las muestras se eluyeron con 3 mL de MeOH (2N HCl). La evaporación se realizó tanto en frío (con hielo) como a temperatura moderada (<45°C), aplicando en ambos casos flujo de nitrógeno. El conjunto de resultados obtenidos aplicando la evaporación con calor para todos los homólogos de LAS y de SPC se muestra en la tabla 2.7, que no difieren significativamente de los obtenidos con la evaporación en frío.

En general, las recuperaciones son elevadas y por tanto, la dilución del extracto con agua mejora la interacción de los SPC con la minicolumna SAX. Las mejores recuperaciones se obtuvieron para los lavados realizados con agua (A y B), aunque fueron mayores las pérdidas de los SPC de cadena carboxílica larga cuando la minicolumna se lavó con agua a pH neutro (A).

### **C. Método propuesto**

Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, el método de preconcentración y purificación de LAS y SPC requiere el uso de dos minicolumnas: una Bond Elut C<sub>18</sub> y otra SAX. Ambas son activadas previamente lavándolas sucesivamente con metanol (10mL) y agua (10mL). Se adiciona a la muestra cloruro sódico hasta alcanzar una fuerza iónica de 5 M y dihidrogenofosfato de potasio (0.05M), se acidifica con ácido ortofosfórico (pH = 1.5) y se pasa a través de una minicolumna Bond Elut C<sub>18</sub> a unos 2 mL·min<sup>-1</sup>. Esta minicolumna se lava con 1 mL de H<sub>2</sub>O (pH neutro) y se eluye con 10mL MeOH. 100 mL de disolución (extracto anterior + 90 mL de agua) son pasados a través de la minicolumna de intercambio aniónico (SAX), que posteriormente se lava con 1 mL de H<sub>2</sub>O (2% AcH) y se eluye con 3mL MeOH (2N HCl). El extracto final es evaporado con corriente de N<sub>2</sub> y calor (temperatura inferior a 45°C), y se redisuelve con 1 mL MeOH/H<sub>2</sub>O (80/20).

#### 2.4.4. Prestaciones del método

En la tabla 2.8 se muestran las recuperaciones obtenidas para distintas concentraciones de LAS y SPC representativas desde el punto de vista ambiental. En general son elevadas para todos los compuestos, excepto para el C<sub>2</sub>SPC y el C<sub>3</sub>SPC, debido a su mayor polaridad. Un aumento de las concentraciones (200 y 450 µg·L<sup>-1</sup>) produjo una disminución en las recuperaciones, principalmente para los homólogos de cadena más larga, como consecuencia de la saturación de la minicolumna (Tabor y Barber, 1996). Las recuperaciones de estos compuestos fueron sensiblemente superiores cuando se prepararon mezclas sin tantos analitos (sólo C<sub>10</sub>-C<sub>13</sub>SPC y LAS comercial). En cualquier caso, estas concentraciones son mucho mayores que las detectadas en el medio, incluso en zonas altamente contaminadas.

**Tabla 2.8. Porcentajes de recuperación y desviaciones estándar (n =3) obtenidos para el LAS y los SPC utilizando el método propuesto a concentraciones de cada homólogo indicadas.**

Compuesto	Concentración (µg·L <sup>-1</sup> )				
	10	50	100	200	450
C <sub>2</sub> SPC	3 ± 1	2 ± 0	3 ± 1	1 ± 1	1 ± 1
C <sub>3</sub> SPC	20 ± 1	15 ± 2	20 ± 2	11 ± 2	5 ± 1
C <sub>4</sub> SPC	84 ± 2	89 ± 5	92 ± 3	48 ± 8	20 ± 1
C <sub>5</sub> SPC	100 ± 3	108 ± 2	105 ± 1	84 ± 4	80 ± 1
C <sub>6</sub> SPC	103 ± 3	109 ± 3	102 ± 3	91 ± 1	84 ± 2
C <sub>8</sub> SPC	105 ± 5	103 ± 2	104 ± 1	83 ± 5	77 ± 2
C <sub>9</sub> SPC	104 ± 7	135 ± 2	108 ± 9	102 ± 7	97 ± 5
C <sub>10</sub> SPC	95 ± 5	103 ± 3	101 ± 2	91 ± 3	75 ± 3
C <sub>11</sub> SPC	101 ± 6	99 ± 1	96 ± 2	89 ± 3	77 ± 2
C <sub>12</sub> SPC	99 ± 8	95 ± 3	90 ± 5	87 ± 4	79 ± 4
C <sub>13</sub> SPC	108 ± 7	94 ± 4	79 ± 5	79 ± 6	73 ± 1
C <sub>10</sub> LAS	91 ± 7	91 ± 7	69 ± 6	65 ± 4	55 ± 3
C <sub>11</sub> LAS	102 ± 10	71 ± 5	65 ± 5	64 ± 4	59 ± 2
C <sub>12</sub> LAS	108 ± 5	57 ± 3	64 ± 3	60 ± 2	56 ± 1
C <sub>13</sub> LAS	72 ± 7	35 ± 3	47 ± 1	48 ± 3	45 ± 4

### A. Volumen de ruptura

En la figura 2.5 se muestran las recuperaciones obtenidas para distintos volúmenes de disolución (100, 250 y 500 mL de agua de mar dopados con 5  $\mu\text{g}$  de LAS y de SPC). En concordancia con los resultados anteriores las recuperaciones fueron elevadas excepto para C<sub>2</sub> y C<sub>3</sub>SPC. Las recuperaciones fueron similares para 250 y 500 mL, y ligeramente inferiores a las de 100 mL. Sin embargo las diferencias en cuanto a las desviaciones estándar fueron significativas al aumentar el volumen.

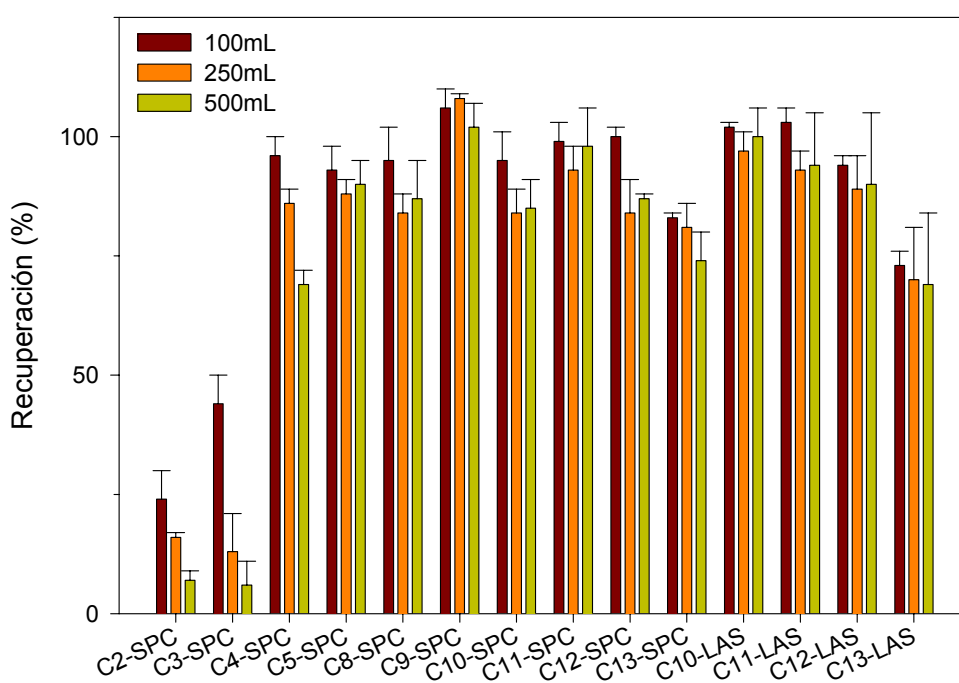


Figura 2.5. Recuperaciones y desviaciones estándar (n=3) obtenidas para distintos volúmenes (100, 250 y 500 mL) de muestras de agua de mar dopadas con homólogos de LAS y SPC.

### B. Curvas de calibración y límite de detección

Las curvas de calibración obtenidas para la extracción en fase sólida de 100 mL de agua de mar dopada con 10, 50, 100, 200 y 450  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de cada homólogo de LAS y SPCs se muestran en la tabla 2.9. La variable Y representa la cantidad inyectada ( $\mu\text{g}$ ) y X

es el área de pico. El comportamiento de todos los compuestos fue lineal, incluso para las mayores concentraciones, exceptuando los SPC de 2 y 3 átomos de carbono en su cadena carboxílica.

**Tabla 2.9. Curvas de calibración obtenidas para el tratamiento de extracción en fase sólida de muestras de agua de mar (100 mL). Intervalo de concentraciones: 10-450  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ .**

Homólogo	Curva de calibración	$r^2$
C <sub>2</sub> SPC	$y = 0.035 + 0.501 \cdot x$	0.558
C <sub>3</sub> SPC	$y = 6.665 + 2.747 \cdot x$	0.504
C <sub>4</sub> SPC	$y = -7.640 + 40.000 \cdot x$	0.997
C <sub>5</sub> SPC	$y = 70.000 + 43.478 \cdot x$	0.995
C <sub>6</sub> SPC	$y = 65.227 + 45.454 \cdot x$	0.996
C <sub>8</sub> SPC	$y = 50.400 + 40.000 \cdot x$	0.992
C <sub>9</sub> SPC	$y = 24.176 + 13.513 \cdot x$	0.971
C <sub>10</sub> SPC	$y = 55.909 + 45.454 \cdot x$	0.993
C <sub>11</sub> SPC	$y = 8.003 + 2.873 \cdot x$	0.986
C <sub>12</sub> SPC	$y = 245.936 + 21.276 \cdot x$	0.920
C <sub>13</sub> SPC	$y = 1.764 + 18.182 \cdot x$	0.988
C <sub>10</sub> LAS	$y = 9.524 + 47.667 \cdot x$	0.976
C <sub>11</sub> LAS	$y = 19.667 + 41.667 \cdot x$	0.982
C <sub>12</sub> LAS	$y = 215.461 + 76.923 \cdot x$	0.970
C <sub>13</sub> LAS	$y = 32.182 + 15.151 \cdot x$	0.912

En la tabla 2.10 se muestran los límites de detección (relación señal-ruido de 3:1) obtenidos para muestras procedentes de diferentes compartimentos ambientales. Los valores son similares para los distintos homólogos de LAS y SPC, aunque el método fue ligeramente menos sensible para el C<sub>12</sub>SPC y el C<sub>13</sub>LAS, debido a la existencia de pequeñas irregularidades en la línea base a sus tiempos de retención así como a su menor recuperación.

En aquellos casos en los que se requieran límites de detección inferiores a los obtenidos, las muestras se pueden procesar en régimen isocrático (González-Mazo y Gómez-Parra, 1996) sin dilución previa. Esta aplicación (flujo de  $1\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  de  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O} + 10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{ NaClO}_4$ ) permite la determinación de los homólogos del LAS y de los del SPC de más de 6 átomos de carbono en su cadena carboxilada.



**Tabla 2.10. Límite de detección para los homólogos de LAS y SPC en muestras marinas-estuariñas utilizando HPLC con detección de fluorescencia.**

	Límite de detección			
	C <sub>4</sub> -C <sub>11</sub> y C <sub>13</sub> SPC	C <sub>12</sub> SPC	C <sub>10</sub> -C <sub>12</sub> LAS	C <sub>13</sub> LAS
Agua ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	0.2	0.4	0.2	0.3
Sedimento ( $\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$ )	5	10	6	7

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos podemos afirmar que el método propuesto permite la determinación simultánea de los homólogos de LAS (C<sub>10</sub>-C<sub>13</sub>) y SPC (C<sub>4</sub>-C<sub>13</sub>) en agua o material particulado, de forma sensible y específica. La bondad de las curvas de calibración y las elevadas recuperaciones obtenidas en el procedimiento de aislamiento y concentración de las muestras dan idea de la alta reproducibilidad y repetitibilidad del método.

## 2.5. BIBLIOGRAFÍA

- Altenbach, B., Giger, W. 1995. Determination of benzene- and naphthalenesulfonates in wastewaters by solid-phase extraction with graphitized carbon black and ion-pair liquid chromatography with UV detection. *Anal. Chem.*, 67, 14: 2325-2333.
- Castles, M. A.; Moore, B. L., Ward, S. R. 1989. Measurement of linear alkylbenzenesulfonates in aqueous environmental matrices by liquid chromatography with fluorescence detection. *Anal. Chem.*, 61: 2534-2540.
- Cavalli, L., Lazzarin, M. 1987. Application of HPLC to surfactants analysis. *Riv. Sostanze Grasse*, 64: 263-267.
- Cavalli, L., Cassani, G., Lazzarin, M., Maraschin, C., Nucci, G., Berna, J.L., Bravo, J., Ferrer, J., Moreno, A. 1996. Iso-branching of LAS of biodegradation study of two models compounds. *Toxicol. Environ. Chem.*, 54, 167-186.
- Crescenzi, C.; Di Corcia, A.; Passariello, G.; Samperi, R., Turnes-Carou, M. I. 1996. Evaluation of two new examples of graphitized carbon blacks for use in solid-phase extraction cartridges. *J. Chromatogr. A.*, 733, 41-55.
- De Henau, H., Matthijs, E., W.D. Hopping. 1986. LAS in sewage sludges, soils and sediments: analytical determination and environmental safety considerations. *Inter. J. Environ. Anal. Chem.*, 26, 279-293.
- Di Corcia, A.; Marchetti, M., Samperi, R. 1991. Liquid chromatographic determination of linear alkylbenzenesulfonates in aqueous environmental samples. *Anal. Chem.*, 63, 11: 1179-1182.
- Di Corcia, A., Marchese, S., Samperi, R. 1993. Evaluation of graphitized carbon black as a selective adsorbent for extracting acidic organic compounds from water. *J. Chromatogr.*, 642, 163-174.
- Di Corcia, A., Samperi, R. 1994. Monitoring aromatic surfactants and their biodegradation intermediates in raw and treated sewages by solid-phase extraction and liquid chromatography. *Environ. Sci. Technol.*, 28, 850-858.
- Di Corcia, A.; Casassa, F.; Crescenzi, C.; Marcomini, A., Samperi, R. 1999a. Investigation of the fate of linear alkyl benzenesulfonates and coproducts in a laboratory biodegradation test by using liquid chromatography/mass spectrometry. *Environ. Sci. Technol.*, 33, 22: 4112-4118.
- Di Corcia, A.; Capuani, L.; Casassa, F.; Marcomini, A., Samperi, R. 1999b. Fate of linear alkyl benzenesulfonates, coproducts, and their metabolites in sewage treatment plants and in receiving river waters. *Environ. Sci. Technol.*, 33, 22: 4119-4125.

- Ding, W. H.; Lo, J. H., Tzing, S. H. 1998. Determination of linear alkylbenzenesulfonates and their degradation products in water samples by gas chromatography with ion-trap mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.*, 818: 270-279.
- Fernandez, P., Valls, M., Bayona, J.M. 1991. Occurrence of cationic surfactants and related products in urban coastal environments. *Environ. Sci. Technol.*, 25: 547-550.
- Field, J. A., Miller, D. J., Field, T. M., Hawthorne, S. B., Giger, W. 1992a. Quantitative determination of sulfonated aliphatic and aromatic surfactants in sewage sludge by ion-pair/supercritical fluid extraction and derivatization gas chromatography/mass spectrometry. *Anal. Chem.*, 64, 24:3161-3167.
- Field, J. A.; Barber, L. B.; Thurman, E. M.; Moore, B. L.; Lawrence, D. L., Peake, D. A. 1992b. Fate of ABS and DATS in sewage-contaminated groundwater. *Environ. Sci. Technol.*, 26, 6: 1140-1148.
- Field, J. A.; Leenheer, J. A.; Thorn, K. A.; Barber, L. Jr.; Rostad, C.; Macalady, D. L., Daniel, S. R. 1992c. Identification of persistent anionic surfactant-derived chemicals in sewage effluent and groundwater. *J. Contaminant Hydrol.*, 9: 55-78.
- Field, J. A.; Field, T. M.; Poiger, T., Giger, W. 1994. Determination of secondary alkane sulfonates in sewage wastewaters by solid-phase extraction and injection-port derivatization gas chromatography/mass spectrometry. *Environ. Sci. Technol.*, 28, 3: 497-503.
- Fujita, I., Ozasa, Y., Tobino, T., Sugimura, T. 1990. Determination of sodium linear alkylbenzene sulfonate in river waters by high-performance liquid chromatography and concentration by octadecilsilica minicolumn. *Chem. Pharm. Bull.*, 38, 5: 1425-1428.
- Fujita, I. 1993. Determination of sodium linear alkylbenzenesulfonate in river water containing household wastewater. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, 50:83-89.
- Giger, W., Brunner, P.G., Schaffner, C. 1984. 4-Nonylphenol in sewage sludge: Accumulation of toxic metabolites from nonionic surfactants. *Science*, 225,:623-625.
- González-Mazo, E., Gómez-Parra, A. 1996. Monitoring anionic surfactants (LAS) and their intermediate degradation products in the marine environment. *Trends Anal. Chem.*, 15, 8: 375-380.
- González-Mazo, E.; Honing, M.; Barceló, D., Gómez-Parra, A. 1997. Monitoring long-chain intermediate products from the degradation of linear alkylbenzene sulfonates in the marine environment by solid-phase extraction followed by liquid chromatography/iospray mass spectrometry. *Environ. Sci. Technol.*, 31, 2: 504-510.
- González-Mazo, E.; Forja, J. M., y Gómez-Parra, A. 1998. Fate and distribution of linear alkylbenzene sulfonates in the littoral environment. *Environ. Sci. Technol.*, 32, 11: 1636-1641.

- Greenwald, R., Chaykosky, M., Corey, E.J. 1963. The Wittig reaction using methylsulfinyl carbanion-dimethyl sulfoxide. *J. Org. Chem.*, 28 :1128.
- Hawthorne, S.B., Miller, D.J., Walker, D.D., Whittington, E.E., Moore, B.L. 1991. Quantitative extraction of linear alkylbenzenesulfonates (LAS) using supercritical CO<sub>2</sub> and a simple device for adding modifiers. *J. Chromatogr.* 541:185-194.
- Heining, K.; Vogt, C., Werner, G. 1998. Determination of linear alkylbenzenesulfonates in industrial and environmental samples by capillary electrophoresis. *Analyst*, 123: 349-3453.
- Holt, M.S., Matthijs, M., Waters, J. 1989. The concentration and fate of linear alkylbenzene sulphonate in sludge amended soils. *Wat. Res.*, 6: 749-759.
- Hon-nami, H., Hanya, T. 1980. Difference in the composition of linear alkylbenzene sulfonate homologues in river sediment and river water. *Jap. J. Limnol.*, 41, 1: 1-4.
- Inaba, K., Amano, K. 1988. HPLC determination of linear alkylbenzenesulfonate (LAS) in aquatic environment. Seasonal changes in LAS concentration in polluted lake water and sediment. *Inter. J. Environ. Anal. Chem.* 34: 203-213.
- Kikuchi, M.; Tokai, A., Yoshida, T. 1986. Determination of trace levels of linear alkylbenzenesulfonates in the marine environment by HPLC. *Wat. Res.* 20, 5: 643-650.
- Knepper, T. P., Kruse, M. 2000. Investigations into the formation of sulfophenylcarboxylates (SPC) from linear alkylbenzenesulfonates (LAS) by liquid chromatography/mass spectrometry. *Tenside Surfact. Det.*, 37:41-47.
- Kölbener, P.; Ritter, A.; Corradini, F.; Baumann, U., Cook, A. M. 1996. Refractory organic carbon and sulfur in the biotransformed by-products in commercial LAS. Identifications of arylsulfonates. *Tenside Surfact. Det.*, 33, 2: 149-156.
- Kreisselmeier, A., Durbeck, H.W. 1997. Determination of alkylphenols, alkylphenoethoxylates and linear alkylbenzenesulfonates in sediments by accelerated solvent extraction and supercritical fluid extraction. *J. Chromatogr.A.*, 775: 187-296.
- Linder, D. E., Allen, M. C. 1982. HPLC analysis of intact and partially biodegraded linear alkylbenzenesulfonates. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 59, 3: 152-155.
- Marcomini, A., Giger, W. 1987. Simultaneous determination of linear alkylbenzenesulfonates, alkylphenol polyethoxylates and nonylphenol by HPLC. *J. Am. Chem. Soc.*, 59, 13: 1709-1715.
- Marcomini, A.; Stelluto, S., Pavoni, B. 1989. Determination of linear alkylbenzenesulphonates and alkylphenol polyethoxylates in commercial products and marine waters by reversed- and normal-phase HPLC. *Inter. J. Environ. Anal. Chem.* 35: 207-218.

- Marcomini, A.; Cecchi, F., Sfriso, A. 1991. Analytical extraction and environmental removal of alkylbenzenesulphonates, nonylphenol and nonylphenol monoethoxylate from dated sludge-only landfills. *Environ. Technol.*, 12: 1047-1054.
- Marcomini, A. Di Corcia, R. Samperi, S. Capri. 1993. Reserved-phase HPLC determination of linear alkylbenzene sulphonates, nonylphenol polyethoxylates and their biotransformation products. *J. Chromatogr.* 647, 219/644:59-71.
- Matthijs, E., De Henau, H. 1987. Determination of linear alkylbenzenesulfonates in aqueous samples sediments, sludges and soils using HPLC. *Tenside Surfact. Det.*, 24, 4: 193-198.
- Matthijs, E., Stalmans, M. 1993. Monitoring of LAS in the North Sea. *Tenside Surfact. Det.*, 30, 1: 29-33.
- McEvoy, J., Giger, W. 1986. Determination of LAS in sewage sludge by High-Resolution Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *Environ. Sci. Technol.*, 20, 4:376-383.
- Nielsen, A. M.; Britton, L. N.; Beall, C. E.; McCormick, T. P., Russell, G. L. 1997. Biodegradation of coproducts of commercial linear alkylbenzene sulfonate. *Environ. Sci. Technol.*, 31, 12: 3397-3404.
- Prats, D., Ruiz, F., Vázquez, B., Zarzo, D., Berna, J. L., Moreno, A. 1993. LAS homolog distribution shift during wastewater treatment and composting: ecological implications. *Environ. Toxicol. Chem.*, 12: 1599-1608.
- Reiser, R.; Toljander, H.; Albrecht, A., Giger, W. 1997. Alkylbenzenesulfonates in recent lake sediments as molecular markers for the environmental behavior of detergent-derived chemicals. ACS SYMPOSIUM SERIES 671, Molecular Markers in Environmental Geochemistry, R.P. Eganhouse Editor, pp.196-212.
- Riu, J.; Eichhorn, P.; Guerrero, J. A.; Knepper, T. P., Barceló, D. 2000. Determination of linear alkylbenzenesulfonates in wastewater treatment plants and coastal waters by automated solid-phase extraction followed by capillary electrophoresis-UV detection and confirmation by capillary electrophoresis-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.*, 889:221-229.
- Saito, T.; Higashi, K., Hagiwara, K. 1982. Determination of traces of sodium alkylbenzenesulphonate by HPLC. Application to water. *Anal. Chem.* 313, 21-23.
- Sanagi, M. M.; Ahmad, U. K.; Hassan, K., Musa, G. 1996. Alkylbenzenes as a retention-index scale in reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.*, 722, 59-68.
- Sarrazin, L.; Arnoux, A., Rebouillon, P. 1997. High-performance liquid chromatographic analysis of a linear alkylbenzenesulfonate and its environmental biodegradation metabolites. *J. Chromatogr. A.*, 760: 285-291.

- Sarrazin, L.; Wafo, W.; Rebouillon, P. 1999. Determination of a linear alkylbenzenesulfonate and its biodegradation intermediates in sea water using solid-phase extraction and RP-HPLC with UV detection. *J. Liquid Chromatogr. Rel. Technol.*, 22, 16: 2511-2524.
- Smith, D.L. 1997. Impact of composition on the performance of sodium linear alkylbenzenesulfonate (NaLAS). *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 74, 7: 837-845.
- Stephanou, E., Giger, W. 1982. Persistent organic chemicals in sewage effluents. 2. Quantitative determinations of nonylphenols and nonylphenol ethoxylates by glass capillary gas chromatography. *Environ. Sci. Technol.*, 16:800.
- Swisher, R.D., Gledhill, W.E., Kimerle, R.A., Taulli, T.A. 1978. Carboxylated intermediates in the biodegradation of linear alkylbenzene sulfonate (LAS). En:Proceedings VII International Congress on Surface-active Substances, USSR National Committee on Surface Active Substances, Moscú, vol. 4, 1978, 218.
- Tabor, C. F., Barber, L. B. 1996. Fate of linear alkylbenzene sulfonate in the Mississippi River. *Environ. Sci. Technol.*, 30, 1:161-171.
- Taylor, P.W., Nickless, G. 1979. Paired-ion high-performance liquid chromatography of partially biodegraded linear alkylbenzenesulphonate, *J. Chromatogr.*, 179: 259-269.
- Terzic, S., Hrsak, D., Ahel, M. 1992. Primary biodegradation kinetics of LAS in estuarine waters. *Wat. Res.*, 26, 5:585-591.
- Terzic, S., Ahel, M. 1994. Input and behaviour of linear alkylbenzenesulphonates (LAS) in a stratified estuary. *Mar. Pollut. Bull.*, 28, 12:735-740.
- Tolls, J.; Haller, M., Sijm, D.T.H.M. 1999. Extraction and isolation of linear alkylbenzenesulfonate and its sulfophenylcarboxylic acid metabolites from fish samples. *Anal. Chem.*, 71, 22:5242-5247.
- Tong, S. L., Tan, C. B. 1993. Determination of branched and linear alkylbenzenesulfonates (BAS and LAS) in water using HPLC. *Inter. J. Environ. Anal. Chem.* 50, 73-82.
- Trattles, M.J. 1980. 10<sup>th</sup> Annual Symposium on the analytical chemistry of pollutants. Dortmund.
- Trehy, M. L., Gledhill, W. E., Orth, G. 1990. Determination of LAS and dialkyltetralinsulfonates in water and sediment by GC/MS. *Anal. Chem.*, 62, 2581-2586.
- Trehy, M.L., Gledhill, W.E., Mieure, J.P., Adamove, J.E., Nielsen, A.M., Perkins, H.O., Eckhoff, W.S. 1996. Environmental monitoring for linear alkylbenzene sulfonates, dialkyltetralin sulfonates and their biodegradation intermediates. *Environ. Toxicol. Chem.*, 15, 233-240.
- Ventura, F.; Caixach, J.; Romero, J.; Espadaler, I., Rivera, J. 1992. New methods for the identification of surfactants and their acidic metabolites in raw and drinking water: FAB-MS and MS/MS. *Wat. Sci. Technol.*, 25, 11: 257-264.

Vogt, C., Heining, K. 1998. Surfactant analysis by capillary electrophoresis. *Tenside Surfact. Det.*, 6:470-475.

Waters, J., Garrigan, J.T. 1983. An improved microdesulphonation/gas liquid chromatography procedure for the determination of linear alkylbenzene sulphonates. *Wat. Res.*, 17, 11:1549-1562.

Wilkbold, R. 1971. Enrichment and separation of surfactants from surface waters by transpot at the gas/water interface. *Tenside Det.*, 8:61-63.

de Wolfe W., Feijtel, T. Submitted Proceedings for the Conference "Management and fate of toxic organics in sludge applied to land". Copenhagen, 1997.

Yamini, Y., Ashraf-Khorassani, M. 1994. Evaluation of octadecyl-bonded membrane disks for extraction surfactants from water. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 348: 251-252.

### **3. BIODEGRADACIÓN DEL ALQUILBENCENO LINEAL SULFONATO (LAS) EN EL MEDIO MARINO**



### 3.1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS

El alquilbenceno lineal sulfonato está considerado como un compuesto biodegradable por la alta tasa de degradación alcanzada en distintos sistemas (Huddleston y Nielsen, 1979; Steber, 1979; Swisher, 1981, 1987; Larson *et al.*, 1993; Moreno *et al.*, 1998; Vives-Rego *et al.*, 2000). Sin embargo se han encontrado concentraciones apreciables de LAS y la presencia de intermedios de degradación en los efluentes de las plantas de tratamiento, así como una acumulación de LAS en los lodos de los digestores anaeróbicos y en sedimentos de sistemas de agua dulce y marinos.

La degradación del LAS comienza en la propia red de saneamiento de las poblaciones, en las que se elimina entre un 12 y un 60% del total consumido (Moreno *et al.*, 1990; Cavalli *et al.*, 1993; Holt *et al.*, 1998). Buena parte del LAS presente en el agua residual está asociado a los sólidos en suspensión (60-70%, en Cavalli *et al.*, 1993), hecho que puede reducir su biodisponibilidad y, por tanto, su biodegradación. Aun en estas condiciones, la eliminación en las plantas de tratamiento de aguas residuales con tratamiento terciario supera el 85% (Trehy *et al.*, 1996; Holt *et al.*, 1998), y el 95% si cuentan con tratamiento de lodos activos (Berna *et al.*, 1993; Feijtel *et al.*, 1996; Trehy *et al.*, 1996; Cavalli *et al.*, 1996b). En lo que respecta a la mineralización del LAS (degradación completa a  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{SO}_4^{2-}$ ), en las plantas depuradoras supera el 90% cuando se realiza el tratamiento con lodos activos (Berna *et al.*, 1993) y, en muchos casos, está por encima del 95% (Cavalli *et al.*, 1996b).

La biodegradación en el medio natural debe ser estudiada con mayor detenimiento, ya que todavía existen numerosos vertidos que se realizan sin tratamiento previo, tanto a los sistemas continentales como costeros. Los estudios de biodegradación del LAS en el medio marino son escasos (e.g.: Hon-nami y Hanya, 1980; Devescopi *et al.*, 1986; Vives-Rego *et al.*, 1987; Sales *et al.*, 1987; Quiroga *et al.*, 1989; Quiroga y Sales, 1990), a pesar de que este sistema constituye el último receptor de las aguas residuales. En general los niveles de LAS encontrados en el medio marino son bajos, tanto en fase disuelta como en los sólidos en suspensión y sedimentos (ver tabla 5.4, capítulo 5 de la presente memoria), por lo que puede inferirse que la degradación tiene lugar en una gran extensión. No obstante, en algunos lugares que reciben aguas residuales urbanas sin tratar se ha apreciado un aumento progresivo de su concentración, por lo que puede admitirse que la velocidad del proceso no debe ser elevada. De hecho, en determinados sistemas se han detectado concentraciones

significativas de LAS (Hon-nami y Hanya, 1980; Painter y Zabel, 1989), especialmente en las aguas costeras y estuáricas (González-Mazo *et al.*, 1997b; 1998), que son las más productivas y también las más sensibles en lo que respecta a su actividad biológica (Bressan *et al.*, 1989; Lewis, 1991).

### 3.1.1. Mecanismo de biodegradación del LAS

La degradación del LAS transcurre en dos etapas, una inicial y rápida en la que se altera la estructura del compuesto y pierde algunas propiedades fisicoquímicas (tensioactividad), denominada *biotransformación* o *biodegradación primaria*, y otra posterior en la que se produce su *mineralización*. Esta última etapa implica la descomposición completa de la molécula en CO<sub>2</sub>, agua y sulfato.

La ruta de biodegradación aerobia del LAS comúnmente aceptada (Fig. 3.1), comienza con una  $\omega$ -oxidación del grupo metilo terminal de la cadena alquílica, en la que se obtiene la formación sucesiva de un alcohol, un aldehído y un ácido sulfofenilcarboxílico (Huddleston y Allred, 1963). A continuación la cadena sufre una  $\beta$ -oxidación, por la que se eliminan secuencialmente dos unidades de carbono como acetil-coenzima A (Swisher, 1963,1964; Huddleston y Allred, 1963). Los organismos aerobios desarrollan la  $\beta$ -oxidación generando los correspondientes SPC hasta el carbono terciario, que impide la continuación del proceso (Swisher,1987; Schöberl, 1989; Schöberl,1993; White y Russel, 1994). La degradación continúa con la desulfonación y la ruptura del anillo aromático, aunque el orden en que ambos procesos se desarrollan es motivo de discusión (Swisher, 1972). Por último, las moléculas resultantes se mineralizan o se incorporan a la biomasa celular de los organismos responsables de la degradación.

A continuación se describe la ruta de biodegradación del LAS, de forma más detallada, para cada una de las etapas del proceso, así como las principales variables que le afectan.

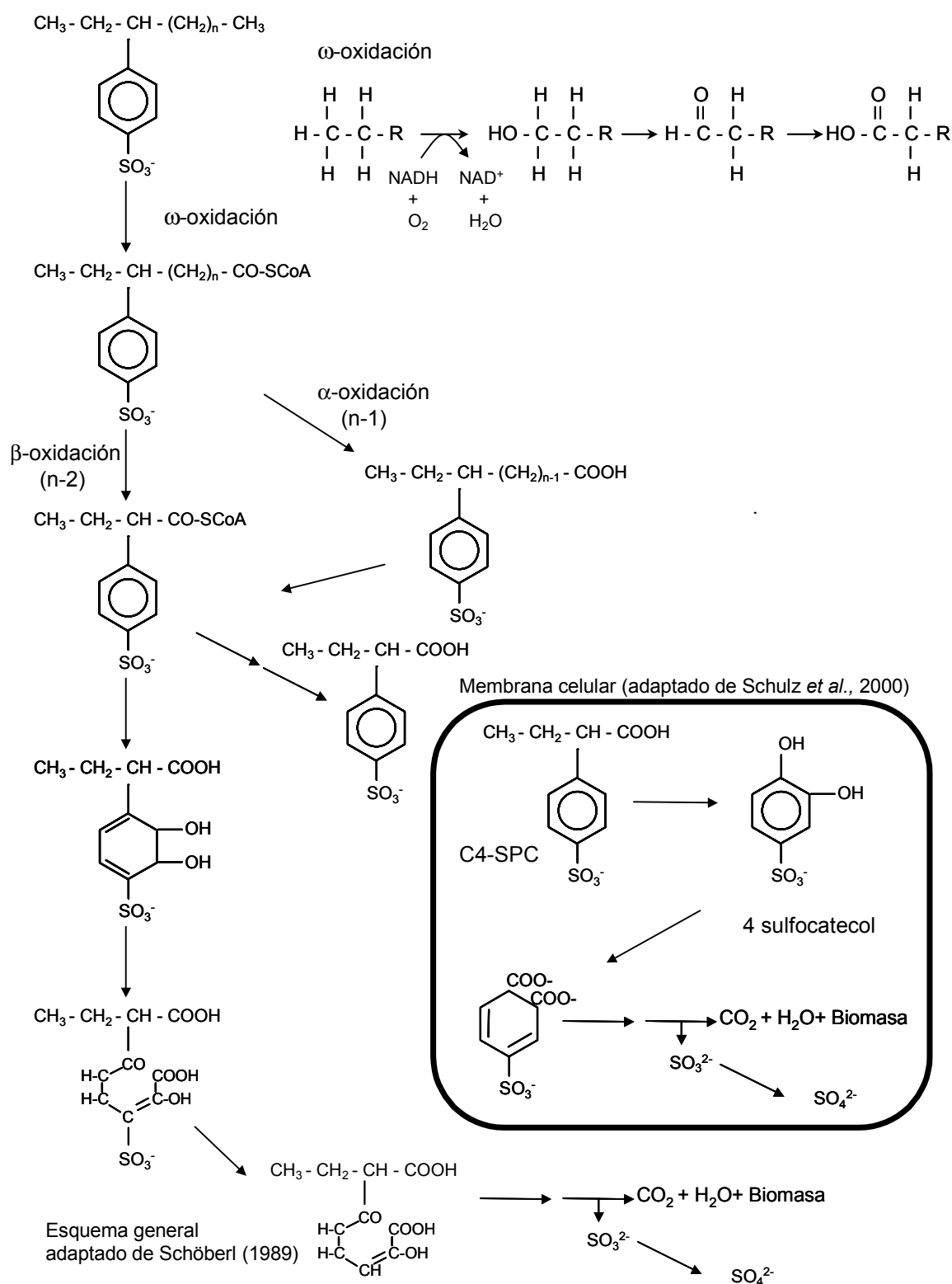


Figura 3.1. Mecanismo de biodegradación del LAS, tal y como lo describió Schöberl (1989), incluyendo también los últimos avances descritos por Schulz *et al.*, (2000).

### A. Oxidación de la cadena alquílica

La presencia de ácidos sulfofenilcarboxílicos en estudios realizados en laboratorio (Divo y Cardini, 1980; Swisher, 1987; Schöberl, 1993; Di Corcia *et al.*, 1994; Nielsen *et al.*, 1997; Di Corcia *et al.*, 1999a; Knepper y Kruse, 2000), en efluentes de aguas residuales (Field *et al.*, 1992a; Trehy *et al.*, 1996), en aguas superficiales receptoras de efluentes (Trehy *et al.*, 1996; Cavalli *et al.*, 1991), en aguas subterráneas (Field *et al.*, 1992a) y en el medio marino (González-Mazo *et al.*, 1997a), ha demostrado la existencia de la oxidación de la cadena alquílica en la ruta de biodegradación del LAS (Tabla 3.1).

La oxidación de la cadena alquílica se inicia con la  $\omega$ -oxidación del metilo más alejado del enlace con el anillo aromático, generándose un ácido sulfofenilcarboxílico (Huddleston y Allred, 1963; Swisher, 1963; 1987; Divo y Cardini, 1980; Di Corcia *et al.*, 1999a; Knepper y Kruse, 2000). La existencia de esta reacción se ha constatado en ensayos de degradación en el laboratorio a raíz de la detección de C<sub>10</sub>SPC a partir del C<sub>10</sub>LAS (Huddleston y Allred, 1963), y en el medio marino al detectarse el C<sub>13</sub>SPC ( $\omega$ -carboxilato del C<sub>13</sub>LAS) en agua intersticial de los sedimentos de la bahía de Cádiz (González-Mazo *et al.*, 1997a). La  $\omega$ -oxidación se produce preferentemente sobre los homólogos de cadena alquílica más larga y sobre los isómeros externos, como consecuencia del impedimento estérico que produce el anillo aromático sobre la catálisis enzimática de esta reacción (Swisher, 1987).

Una vez que ha tenido lugar la  $\omega$ -oxidación se produce el acortamiento de la cadena alquílica fundamentalmente a través de sucesivas  $\beta$ -oxidaciones, que reducen en 2 átomos de carbono la cadena (Swisher 1987) hasta llegar a una longitud 4 o 5 átomos de carbono. Esta etapa ha sido confirmada en numerosos experimentos (Tabla 3.1), en los que los homólogos del LAS de cadena par generaron intermedios de degradación de cadena carboxílica par, y se obtuvieron SPC impares a partir de homólogos de LAS impares.

Aunque la  $\beta$ -oxidación es la vía predominante en el acortamiento de la cadena alquílica, no es la única, ya que se han detectado concentraciones bajas de intermedios de degradación (Swisher, 1963; Swisher, 1964; Cain *et al.*, 1972; Schöberl, 1989; Cavalli *et al.*, 1996c) generados por retirada de un átomo de carbono ( $\alpha$ -oxidación). La  $\omega$ -oxidación se puede producir únicamente en presencia de oxígeno, mientras que la  $\beta$ -oxidación puede darse sin él empleando el agua como aceptora de electrones (Swisher,

1987; Schöberl, 1989).

**Tabla 3.1. Principales intermedios de degradación detectados en experimentos de biodegradación de distintos LAS realizados con aguas residuales o continentales.**

Compuesto Estudiado	Productos mayoritarios	Productos Minoritarios	Referencia
LAS		C <sub>6</sub> -C <sub>8</sub> SPC	Taylor y Nickless, 1979
LAS comercial	C <sub>4</sub> SPC	C <sub>5</sub> a C <sub>11</sub> SPC	Kolbener <i>et al.</i> , 1996
LAS comercial	C <sub>6</sub> SPC	C <sub>3</sub> -C <sub>10</sub> SPC	Kolbener <i>et al.</i> , 1996
LAS comercial	C <sub>6</sub> SPC, C <sub>7</sub> SPC	C <sub>5</sub> SPDC, C <sub>7</sub> SPDC	Di Corcia <i>et al.</i> , 1999a
LAS comercial	C <sub>6</sub> SPC	C <sub>5</sub> SPC, C <sub>7</sub> SPC, C <sub>8</sub> SPC	Knepper y Kruse, 2000
C <sub>9</sub> LAS	4C <sub>5</sub> SPC		Hrsak, 1996
2φC <sub>10</sub> LAS		C <sub>10</sub> SPC	Huddleston y Allred, 1963
C <sub>10</sub> LAS	3C <sub>4</sub> SPC		Hrsak, 1996
C <sub>11</sub> LAS	C <sub>3</sub> SPC		Willeys y Cain, 1972
C <sub>11</sub> LAS	C <sub>5</sub> SPC		Divo y Cardini, 1980
C <sub>11</sub> LAS	C <sub>5</sub> SPC, C <sub>7</sub> SPC	C <sub>4</sub> SPDC	Di Corcia <i>et al.</i> , 1994
C <sub>11</sub> LAS	C <sub>5</sub> SPC	C <sub>7</sub> SPC	Hrsak y Grbic-Galic, 1995
C <sub>11</sub> LAS	C <sub>5</sub> SPC		Hrsak, 1996
C <sub>12</sub> LAS	C <sub>2</sub> SPC, C <sub>4</sub> SPC		Bird y Cain, 1972
C <sub>12</sub> LAS	C <sub>4</sub> SPC, C <sub>6</sub> SPC		Divo y Cardini, 1980
C <sub>12</sub> LAS	C <sub>6</sub> SPC	C <sub>8</sub> SPC, C <sub>4</sub> SPC	Di Corcia <i>et al.</i> , 1994
C <sub>13</sub> LAS	C <sub>5</sub> SPC, C <sub>7</sub> SPC		Divo y Cardini, 1980
C <sub>10</sub> SPC	C <sub>4</sub> SPC		Hrsak, 1996
C <sub>11</sub> SPC	C <sub>5</sub> SPC	C <sub>7</sub> SPC	Hrsak y Grbic-Galic, 1995

El proceso de biodegradación de los ácidos sulfonilcarboxílicos (SPC) es más lento que el del LAS, ya que las bacterias tienen que adaptarse para degradar los intermedios generados (Swisher, 1972; Swisher, 1987). Los SPC que se caracterizan por su elevada persistencia fueron denominados como “intermedios clave” por Swisher (1987). Su detección y acumulación constituye la etapa limitante en el proceso (Hrsak *et al.*, 1981), hasta que se produce un cambio en comunidad bacteriana o los enzimas necesarios para su degradación. Las mayores concentraciones de SPC detectadas en los distintos sistemas y experimentos (ver tabla 3.1) corresponden a los de longitud de cadena intermedia (C<sub>5</sub>-C<sub>8</sub>SPC), constituyendo éstos los llamados “intermedios clave” en el proceso de degradación. En este sentido, Cavalli *et al.*, (1993) observaron que en el

efluente de una planta de tratamiento de aguas residuales la longitud de cadena media de los SPC fue de 6 átomos de carbono. La oxidación para los SPC de mayor peso molecular debe ser un proceso rápido, y por tanto no se acumulan y no son detectados usualmente.

La oxidación puede desarrollar también sobre el metilo terminal más próximo al enlace con el grupo sulfofenilo, una vez que el otro extremo ha sufrido la  $\beta$ -oxidación, dando lugar a los ácidos sulfofenildicarboxílicos. Su formación debe producirse probablemente a partir de los isómeros más internos del LAS, ya que estos compuestos contienen a ambos lados del grupo fenilo dos cadenas alquílicas relativamente largas. Los ácidos sulfofenildicarboxílicos han sido detectados como intermedios minoritarios de la degradación del LAS, ya que se forman en menor extensión que los monocarboxílicos (Di Corcia *et al.*, 1999 a,b).

### **B. Ruptura del anillo aromático y desulfonación**

Una vez que ha tenido lugar la biodegradación primaria, se produce la desulfonación y la ruptura del anillo aromático (Swisher, 1987; Schöberl, 1989; Painter, 1992). En numerosos experimentos se ha observado que la desulfonación del LAS tiene lugar después de la oxidación de la cadena alquílica (Schöberl, 1989; Jiménez *et al.*, 1991; Painter, 1992; Sigoillot y Nguyen, 1992), aunque en otros ensayos se ha producido primero la ruptura del anillo. Este último proceso puede ocurrir mediante una hidroxilación catalizada por la monooxigenasa en condiciones ácidas, o mediante una reducción (Scott y Jones, 2000).

Para la ruptura del anillo aromático se han propuesto (Fig. 3.1) varios mecanismos (Schöberl, 1989): ruptura del anillo (pirocatecol o 1,2-benzenodiol) sin cadena carboxilada en posición *orto* y la ruptura en posición *meta*. Esta última parece la más probable para el LAS, ya que ha sido probada por Baggi *et al.*, (1972) para butilbenceno y pentilbenceno, y por Focht y Williams (1970) para el p-toluensulfonato. Sin embargo según Swisher (1972), la ruptura se realiza vía *meta* si el número de átomos de carbono en la cadena alquílica es par (ácido 4-hidroxifenilacético a ácido dihidroxifenilacético) o vía *orto* si es impar (ácido 4-hidroxybenzoico a ácido 3,4-dihidroxybenzoico), generando en ambos casos ácidos pirúvico y succínico. Hasta la fecha no se ha detectado el primer intermedio de degradación y por tanto no se ha

podido caracterizar con precisión el proceso.

La ruptura del anillo incluye la desulfonación como resultado de la actividad monooxigenasa mediante la ruptura *meta* del catecol (1,2-bencenodiol) resultante (Cain, 1981). Recientemente se ha aislado una cepa pura (*Delftia acidovorans* SPB1) capaz de degradar los dos enantiómeros del sulfofenilbutirato -intermedio de la degradación del LAS- vía 4-sulfocatecol (4-sulfo-1,2-bencenodiol) y romper el anillo en posición *orto* (Schulz *et al.*, 2000). La degradación del sulfofenilbutirato no se produce en la misma extensión para ambos enantiómeros, ya que está claramente favorecida para el R, lo que puede ser debido a que la degradación se produzca en el interior de la membrana celular y exista un proceso de transporte selectivo de enantiómeros (Schulz *et al.*, 2000). La degradación de ambos enantiómeros converge en el 4-sulfocatecol, aunque no se sabe con certeza cómo se produce este paso. Sin embargo la vía de degradación del 4-sulfocatecol es conocida, y se desarrolla mediante una ruptura *orto* hacia sulfanilato y 1,3-disulfonatobenceno (Feigel y Knackmuss, 1993; Contzen *et al.*, 1996). En la bibliografía existen muchos mecanismos propuestos para la ruta de biodegradación del LAS (Swisher, 1987; Schöberl, 1989; White y Russell, 1994), pero ninguno incluye la formación del 4-sulfocatecol como intermedio de degradación. Esta ruta de degradación vía sulfocatecol se ha descrito únicamente para el 1 $\phi$ -LAS, y no es representativa de la ruta de degradación del LAS comercial, ya que la cepa aislada por estos autores no es capaz de degradar mezclas de homólogos.

### C. Mineralización

En opinión de numerosos autores, la biodegradación primaria del LAS es rápida y completa (Steber, 1979; Painter y Zabel, 1989; ; Larson, 1990; Moreno y Ferrer, 1991; Nielsen *et al.*, 1993; Cavalli *et al.*, 1996a,b), ya que no se han detectado metabolitos recalcitrantes (Moreno y Ferrer, 1991; Cavalli *et al.*, 1996a,b). Sin embargo su mineralización es más lenta fundamentalmente debido a la fragmentación del anillo aromático (Swisher, 1972; Schöberl, 1989), e incompleta, como han mostrado ensayos que han utilizado LAS marcado con  $^{14}\text{C}$  en el anillo (Steber, 1979; Larson, 1990; Trehy *et al.*, 1990; Schöberl, 1993; Kolbener *et al.*, 1995a,b; Kolbener *et al.*, 1996). La extensión de la mineralización oscila entre el 27 y el 87% cuando se establece a partir de la formación de sulfato, y entre el 37 y el 99% a partir de la formación de  $\text{CO}_2$  (Swisher,

1987). En la mayor parte de los casos, la mineralización supera el 90% (Gerike y Jasiak, 1986; Larson y De Henau, 1988; Berna et al., 1993; Kolbener et al., 1996; Mampel et al., 1998; Moreno et al., 1998), y es incorporado por la biomasa entre un 15 y un 30% (Huddleston y Nielsen, 1979; Nielsen y Huddleston, 1981). El resto no mineralizado (5-20%) lo constituyen fragmentos moleculares de distinta naturaleza (Huddleston y Nielsen, 1979; Kolbener et al., 1996; Mampel et al., 1998). En ensayos realizados con LAS en agua de mar, la mineralización es completa y el 60% del carbono se incorpora a la biomasa celular (Vives-Rego et al., 2000).

La fracción no mineralizada (carbono orgánico refractario) procede en gran parte de los intermedios de degradación de otros productos generados durante el proceso de producción de LAS comercial (Moreno *et al.*, 1988a, Moreno *et al.*, 1988b), como las dialquiltetralinas sulfonadas (DATS) o los alquilbenceno sulfonatos monoramificados, iso-LAS (Kolbener *et al.*, 1995a,b; Kolbener *et al.*, 1996). Aunque la degradación primaria de estos coproductos es llevada a cabo de forma efectiva por los microorganismos presentes en los lodos activos (Nielsen *et al.*, 1997), éstos no son capaces de completar su mineralización (Di Corcia *et al.*, 1999a). La materia orgánica recalcitrante detectada constituye entre un 4 y un 6% procedente del LAS comercial (Kolbener *et al.*, 1996; Schöberl, 1989; Nielsen *et al.*, 1997; Di Corcia *et al.*, 1999a), entre un 40 y un 66% cuando se realiza el ensayo con DATS y de un 35 a un 57% con el iso-LAS (Kolbener *et al.*, 1996; Di Corcia *et al.*, 1999a).

Estas diferencias en la extensión de la degradación se deben a que este proceso es más lento cuando existen metilos ramificados en la cadena alquílica (Di Corcia *et al.*, 1999b). De hecho, durante el tratamiento de aguas residuales se ha constatado que la proporción de LAS, iso-LAS y DATS pasa de 83%, 8.3% y 8.5% en el influente, a 61%, 13% y 26% en el efluente (Di Corcia *et al.*, 1999b). En la fracción recalcitrante se han detectado intermedios de degradación las DATS y del iso-LAS (Di Corcia *et al.*, 1999a; Nielsen *et al.*, 1997), y sin embargo no aparecieron SPC ni material no sulfonado (Kolbener *et al.*, 1996). El LAS utilizado por Di Corcia et al., (1999<sup>a</sup>) en sus ensayos de degradación ha sido sintetizado utilizando  $\text{AlCl}_3$  como catalizador, y presenta por tanto, un mayor contenido en dialquiltetralinas (Smith, 1997) que el producido por otras vías (e.g.: el producido en España por Petroquímica Española, S.A.), con el consiguiente aumento de la fracción recalcitrante al final del proceso.

La mineralización de los intermedios más resistentes, especialmente los



procedentes de las DATS, depende de las condiciones del medio y por tanto de la población microbiana presente (Nielsen *et al.*, 1997). Así la fracción no mineralizada durante el tratamiento de aguas residuales puede ser degradada una vez accede al medio, ya que los organismos presentes tanto en el medio acuático como en suelo son capaces de degradar extensamente el LAS y sus coproductos, así como sus intermedios de degradación (Nielsen *et al.*, 1997). De hecho Mampel *et al.*, (1998) detectaron una extensa desulfonación del carbono orgánico recalcitrante por *Pseudomonas putida* S-313, indicando que en condiciones adecuadas este carbono orgánico es extensa y completamente biodegradado.

Hasta la fecha la determinación de los intermedios de degradación primaria ha sido meramente cualitativa, por la carencia de patrones o de un método de preconcentración adecuado, y su cuantificación se ha realizado para el total de los SPC, suponiendo que presentan una respuesta similar en el detector del cromatógrafo a la del LAS. La caracterización cinética de la biodegradación primaria requiere una cuantificación precisa de sus intermedios de degradación, que no se ha realizado hasta el momento.

### **3.1.2. Estudios de biodegradación en el laboratorio**

Desde un punto de vista ambiental los ensayos de biodegradación pueden clasificarse en: ensayos no representativos desde el punto de vista ambiental, que se realizan generalmente a altas concentraciones, para evaluar la degradación del LAS durante el tratamiento de aguas residuales o facilitar el estudio de la naturaleza del proceso, y ensayos ambientalmente representativos que se desarrollan partiendo de concentraciones de LAS ( $1\text{-}2000\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y condiciones ambientales similares a las detectadas en el medio. Hasta el momento, la mayor parte de los ensayos corresponde a la primera categoría, ya que se requieren técnicas más precisas para abordar experimentos a concentraciones inferiores a  $5\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . En cualquier caso los datos obtenidos en el laboratorio son difíciles de extrapolar al medio natural por las numerosas variables que inciden sobre el proceso de biodegradación.

Los reactores que se suelen utilizar son estáticos (Vives-Rego *et al.*, 2000), para ensayos en los que no hay intercambio con el exterior, o bien de flujo continuo-

quimiostatos (Hrsak *et al.*, 1976; Jiménez *et al.*, 1991; Konopka *et al.*, 1996). Estos últimos son capaces de simular mejor las condiciones ambientales al contemplar en su dispositivo la renovación del sistema, pero también dificultan la modelización del proceso de biodegradación, al aumentar el número de variables implicadas

La caracterización de la degradación del LAS y la formación de sus intermedios de degradación debe realizarse usando técnicas de análisis específicas que permitan la identificación y cuantificación de cada uno de sus intermedios. La mineralización del LAS está limitada por la ruptura del anillo aromático (Larson, 1990; Sigoillot y Nguyen, 1992), por lo que la desaparición de los SPC puede establecerse como criterio específico de mineralización para este compuesto, si no se dispone de compuestos marcados con isótopos radiactivos.

### **3.1.3. Factores que afectan a la biodegradación del LAS**

La extensión y cinética de la biodegradación del LAS depende de las características del compuesto (distribución isomérica y por homólogos, concentración inicial,...) y de las propiedades del medio, tanto microbiológicas (densidad, aclimatación,...) como fisicoquímicas (concentración de sólidos en suspensión, oxígeno disuelto, temperatura, pH, concentración de nutrientes,...).

#### **A. Factores que dependen de la estructura molecular y de la concentración**

El efecto de la concentración inicial de sustrato sobre la biodegradación del LAS no está bien caracterizado. Algunos autores han observado una disminución de la velocidad de biodegradación al aumentar la concentración inicial de LAS, tanto en agua de río (Quiroga y Sales, 1989) como en aguas estuáricas y marinas (Quiroga y Sales, 1991; Terzic *et al.*, 1992b), y otros sin embargo no han detectado influencia de este factor (Dörfler *et al.*, 1996; Pérez-García *et al.*, 1996). Por otro lado se ha observado que en ensayos realizados en agua de mar a temperaturas inferiores a 15°C la degradación del LAS ( $10\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) es independiente de la concentración de tensioactivo (Sales *et al.*, 1987).

La biodegradabilidad del LAS aumenta con la longitud de la cadena alquílica (Swisher, 1963) y con la distancia del enlace del grupo sulfonilo al metilo terminal de la

cadena (Swisher, 1963; Bayona *et al.*, 1986; Roberts, 1991; Perales *et al.*, 1999a,b). Existen numerosos trabajos en aguas continentales (McEvoy y Giger, 1986; Marcomini y Giger, 1988), subterráneas (Field *et al.*, 1992b), estuáricas (Takada e Ishiwatari, 1987; Terzic *et al.*, 1992a; Terzic *et al.*, 1992b) y marinas (González-Mazo *et al.*, 1997b) que indican que el destino y biotransformación del LAS en sistemas naturales depende de factores estructurales. Sin embargo otros autores (Ward *et al.*, 1989; Waters *et al.*, 1989; Larson, 1990) no detectaron ningún efecto sobre la velocidad y extensión de la degradación del LAS en agua de río, a concentraciones ambientalmente representativas (5-500ppb).

## **B. Factores ambientales**

### *Microbiológicos*

La mineralización del LAS es llevada a cabo por asociaciones bacterianas en las que unas cepas utilizan los productos metabólicos de las otras (Quiroga y Sales 1989, Jiménez *et al.*, 1991; Sigoillot y Nguyen, 1992; Hrsak y Begonja, 1998). Una asociación de bacterias es capaz de efectuar la biodegradación superando las capacidades de cada especie por separado (asociaciones sinérgicas). En general los organismos que realizan la mineralización del LAS son de tres tipos: los que realizan la  $\omega$ -oxidación, los que acortan la cadena y los que realizan la desulfonación o la ruptura del anillo (Hrsak y Begonja 1998; Schlenheck *et al.*, 2000). Recientemente Cook y Hrsak (2000) han descrito una estructura poblacional similar con tres grupos distintos de microorganismos como responsables de la degradación del LAS. El primer grupo cataliza la  $\omega$ -oxidación y las primeras  $\beta$ -oxidaciones, estos pueden ser o no de crecimiento heterótrofo. El segundo grupo, de crecimiento heterótrofo, degrada los SPC de cadena intermedia, y por último un tercer grupo que degrada a los ácidos sulfofenilcarboxílicos de cadena corta.

Tanto en sistemas continentales (Jiménez *et al.*, 1991) como marinos (Sigoillot y Nguyen, 1992), la mineralización de LAS es llevada a cabo por un consorcio de 4 microorganismos. Como caso excepcional White y Russell (1994) observaron que un cultivo puro de bacterias fue capaz de degradar completamente un determinado homólogo. Los microorganismos identificados en distintos experimentos como responsables de la degradación del LAS (Tabla 3.2) son fundamentalmente bacterias,

aunque también se han identificado algunos hongos (Ginkel, 1996) o algas verdes (Davis y Gloyna, 1969; Chawla *et al.*, 1987), cuya capacidad de degradación puede ser consecuencia de la actividad de la flora bacteriana asociada.

**Tabla 3.2. Microorganismos responsables de los distintos procesos implicados en la biodegradación del LAS.**

$\omega$ -oxidación	$\beta$ -oxidación	Desulfonación	Ruptura anillo	Referencia
CSC1	Cepa SPC-3 Xanthobacter			Hrsak y Begonja, 1998
Anabaena spHB1017				Yan <i>et al.</i> , 1998
	Flavobacterium, Pseudomonas y Acinetobacter			Sigoillot y Nguyen, 1992
	<i>Chladosporium resnae</i> (hongo)			Ginkel, 1996
	<i>Bacillus sp.</i>			Ginkel, 1996
$\alpha$ -proteobacterium				Schlenheck <i>et al.</i> , 2000
		Delftia acidovorans SPB1		Schulz <i>et al.</i> , 2000
		<i>Pseudomonas putida</i> S-313		Kertesz <i>et al.</i> , 1994

En cualquier caso es necesario tener en cuenta que la mayor parte de estos ensayos se han desarrollado con isómeros u homólogos de LAS específicos, y sin embargo la mezcla comercial está constituida por unos 26 isómeros diferentes. Por tanto, el consorcio responsable de su degradación debe de ser más complejo, tal y como mostró Swisher (1972), al detectar, incluso, que la degradación de los distintos isómeros del C<sub>12</sub>LAS era realizada por bacterias diferentes.

En general los microorganismos marinos están menos capacitados para degradar compuestos xenobióticos que los terrestres (Larson *et al.*, 1993), por lo que las tasas de biodegradación en ambientes costeros son menores. Por ello, la presencia de bacterias halotolerantes de origen continental puede jugar un papel importante en la biodegradación (Sigoillot y Nguyen, 1992). En diversos trabajos se ha observado una correlación entre la densidad de bacterias presentes en el medio y la velocidad o la extensión de la biodegradación (Quiroga y Sales, 1989; Quiroga y Sales, 1991). La

extensión fue mayor para experimentos realizados en agua de mar con sedimento (Quiroga *et al.*, 1989), probablemente como consecuencia del aumento de la densidad de microorganismos al adicionar el material particulado. Sin embargo las bacterias marinas capaces de degradar el LAS representan sólo el 0.1% de la flora bacteriana (Shimp, 1989). En este sentido, es lógico pensar que la biodegradación no esté correlacionada directamente con la densidad bacteriana sino con su actividad (Vives-Rego *et al.*, 1992).

La biodegradación del LAS en ambientes acuáticos suele ir precedida por una fase de aclimatación o periodo de latencia, tanto en sistemas continentales (Hrsak, 1996) y estuáricos (Shimp, 1989) como marinos (Sales *et al.*, 1987; Vives-Rego *et al.*, 2000). La fase de latencia es el periodo de adaptación de los microorganismos a unas nuevas condiciones del medio en el que están inmersos, bien por haberse puesto en contacto por vez primera con un determinado sustrato, o simplemente como aclimatación a las nuevas condiciones a las que se ven sometidos en el ensayo. De hecho parece ser que la actividad bacteriana se reduce después de la inoculación por la presencia de tensioactivo ( $5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), y el proceso de biodegradación se inicia una vez que se han alcanzado la biomasa y actividad máximas (Vives-Rego *et al.*, 1992). En general se han detectado periodos de adaptación desde unas horas (Hrsak, 1995) a una semana (Hrsak, 1996). Otros autores, sin embargo no han detectado la existencia de la fase de latencia (Larson, 1990)

En ambientes estuáricos y marinos se ha observado que la biodegradación es relevante si la flora bacteriana ha estado expuesta previamente al LAS (Shimp, 1989; Quiroga y Sales, 1989). La exposición a aguas residuales favorece el desarrollo de bacterias heterótrofas y de otras capaces de crecer en medio con LAS (Breen *et al.*, 1992). La mineralización del LAS se relaciona directamente con la presencia de estas bacterias, que representan el 23% del total de las heterótrofas que crecen en un medio con LAS (Breen *et al.*, 1992). La proporción de bacterias que contienen plásmidos (DNA plasmídico) es mayor en los sistemas contaminados que en los limpios, ya que están involucrados en el proceso de degradación (Cain, 1981).

### *Fisicoquímicos*

Las velocidades de las reacciones biológicas tienen una dependencia con la temperatura, que normalmente puede describirse por la ecuación de Arrhenius. Esto

explica que se haya encontrado que la biodegradación del LAS está favorecida con la temperatura (Devescopi *et al.*, 1986; Swisher, 1987; Sales *et al.*, 1987; Quiroga *et al.*, 1989; Dörfler *et al.*, 1996), ya que su aumento acelera de forma generalizada todos los procesos metabólicos, y también es capaz de inhibirlos a menos de 3°C (Dörfler *et al.*, 1996). El aumento de la actividad bacteriana con la temperatura se ha demostrado por la disminución de la fase de latencia en ensayos realizados con agua de río (Abe y Kobayashi, 1985; Hrsak, 1996), y por la inhibición de la biodegradación primaria del LAS en agua de mar a 5 y 10°C (Sales *et al.*, 1987).

La biodegradación del LAS es completa en presencia de oxígeno, y de hecho una buena agitación aumenta las tasas de biodegradación, al asegurar una aireación adecuada del reactor (Abe y Kobayashi, 1985). Cuando la concentración de oxígeno es mínima, los aceptores de electrones, sulfato, nitrato o dióxido de carbono, producen sulfuro ( $\text{H}_2\text{S}$ ),  $\text{N}_2$  y/o  $\text{NH}_3$  y  $\text{CH}_4$  respectivamente.

El LAS es persistente en ambientes con poco oxígeno, como digestores de lodos anaeróbicos (Bruce *et al.*, 1966; Oba *et al.*, 1967; Janicke y Hilge, 1979; Gledhill, 1987; Giger *et al.*, 1989; Rapaport y Eckhoff, 1990) o sedimentos continentales anaeróbicos (Federle y Schwab, 1992). También se ha observado que concentraciones elevadas de LAS pueden inhibir la digestión anaeróbica (Swisher, 1987), y por tanto, es lógico esperar que se produzca una acumulación del compuesto en ambientes anóxicos. Según se desprende de algunos trabajos desarrollados hasta hace unos años (Ward, 1986; Larson *et al.*, 1993), la biodegradación anaeróbica del LAS puede desarrollarse únicamente si ha existido una exposición aeróbica previa. Según estos autores si las condiciones son estrictamente anaeróbicas, en todo momento, no tiene lugar este proceso. Esta limitación en la degradación se debe a que la  $\omega$ -oxidación sólo se puede producir en presencia de oxígeno, y en cambio la  $\beta$ -oxidación puede darse sin oxígeno, utilizando el agua como aceptora de electrones (Swisher 1987; Schoberl 1989).

En las aguas subterráneas, el LAS es mineralizado en la zona óxica, y debido a la rapidez del proceso no se detectan los SPC. Sin embargo en aguas subóxicas de este mismo compartimento ambiental sólo se eliminan los homólogos de LAS de cadena más larga y los isómeros externos (Field *et al.*, 1992b; Krueger *et al.*, 1998), siendo la cinética de la degradación más lenta y por ello, sí se detectan los intermedios de degradación (Krueger *et al.*, 1998). Krueger *et al.*, (1998) comprobaron que una concentración de oxígeno de  $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  era suficiente para producir la  $\omega$ -oxidación al 20% del LAS expuesto

(20 mg·L<sup>-1</sup>) en aguas subterráneas. En este mismo sentido, Miura y Nishizawa (1982) concluyeron que el LAS no debe acumularse en sedimentos continentales, ya que su degradación se puede desarrollar a concentraciones de oxígeno disuelto inferiores a 1mg·L<sup>-1</sup>.

En cuanto al grupo benceno, algunos trabajos han mostrado su resistencia a la degradación en el medio natural (Reinhard *et al.*, 1984; Barbaro *et al.*, 1992), y otros sin embargo han observado su biodegradación y la de los alquilbencenos bajo condiciones anaeróbicas (Wilson *et al.*, 1986; Grbic-Galic y Vogel, 1987), o en sedimentos anaeróbicos de estuarios y marismas contaminados por petróleo (Ward *et al.*, 1980). Los estudios más recientes indican que, bajo condiciones apropiadas, el benceno puede oxidarse hasta CO<sub>2</sub> utilizando el sulfato o el Fe(III) como aceptores de electrones. También se ha observado una rápida mineralización del benceno bajo condiciones sulfatorreductoras en sedimentos marinos y de agua dulce, y en acuíferos (Edwards *et al.*, 1992; Lovley *et al.*, 1995; Coates *et al.*, 1996). Kazumi *et al.*, (1997) estimaron que la sulfatorreducción en sedimentos estuáricos es capaz de degradar el 80% del benceno que accede a este compartimento ambiental.

Por tanto, la posibilidad de la degradación del LAS en condiciones anaeróbicas es una cuestión abierta y actualmente objeto de un intenso estudio. La mayor parte de los resultados indican que la oxidación de la cadena alquílica sólo puede tener lugar en condiciones óxicas. Sin embargo en estudios que determinan la desaparición de LAS por métodos específicos (determinación de la concentración de LAS), se ha observado una cierta degradación en condiciones anaeróbicas (Giger *et al.*, 1987; Berna *et al.*, 1989; Sanz *et al.*, 1999; Angelidaki *et al.*, 2000; Prats *et al.*, 2000). La extensión de la biodegradación primaria en estas condiciones se ha estimado entre el 40 y el 85% después de 250 días (Prats *et al.*, 2000), y entre un 14 y un 25% para el C<sub>12</sub>LAS durante la digestión con lodos residuales (Angelidaki *et al.*, 2000). La existencia de biodegradación primaria, puede conducirnos a la posibilidad de mineralización en condiciones anaeróbicas, aunque esta cuestión debe ser estudiada con mayor profundidad.

La extensión de la biodegradación del LAS aumenta en presencia de sedimento en suspensión (Sales *et al.*, 1984; Shimp 1989; Larson *et al.*, 1993), debido probablemente al incremento de la densidad microbiana. Sin embargo la cinética de degradación parece ser que no está afectada por este factor (Shimp, 1989; Larson, 1990). Knaebel *et al.*, (1994), por el contrario, encontraron una correlación negativa entre

el coeficiente de adsorción del LAS y su mineralización, debido principalmente a la reducción de la biodisponibilidad cuando la molécula está intensamente adsorbida. Este hecho ha sido corroborado recientemente para el C<sub>12</sub>LAS (Angelidaki et al., 2000).

Además de las variables fisicoquímicas anteriores, pueden incidir en la degradación del LAS otras como el pH, la salinidad o la presencia de otros contaminantes. La influencia del pH viene determinada por su influencia sobre el tipo de microorganismos presentes en el medio (Ratledge, 1991). En general se ha observado una correlación positiva entre la mineralización y la extensión de la degradación con el pH (Dörfler *et al.*, 1996). La salinidad influye de forma indirecta en la degradación, ya que disminuye la solubilidad del LAS (Quiroga *et al.*, 1989), y por tanto, su biodisponibilidad (Verge *et al.*, 2001). Por la misma razón, la presencia de compuestos catiónicos (cloruros de trimetilamonio mono- y di-alquilados), que forman complejos con el LAS, reduce la degradación del LAS entre un 29 y un 56% (Verge *et al.*, 2001).

#### 3.1.4. Cinética del proceso de biodegradación del LAS

La degradación del LAS se ha considerado generalmente que se desarrolla según una cinética de primer orden, tanto si la velocidad de degradación se expresa a partir del consumo del sustrato como si se hace a partir de la producción de CO<sub>2</sub> (Larson y Payne, 1981; Larson *et al.*, 1989; Larson, 1990; Knaebel *et al.*, 1990). Con esta aproximación se han determinado los parámetros cinéticos para la biodegradación primaria del LAS, algunos de los cuales se recogen en la tabla 3.3. En cualquier caso, la aproximación a una cinética de primer orden es adecuada, siempre y cuando no se considere el tiempo durante el cual se produce la fase de aclimatación de los microorganismos a la sustancia a degradar.

Ensayos realizados en laboratorio con agua de lago, a la que se adicionaba perifiton o suelo, han mostrado que la mineralización del LAS transcurre en dos fases (Nielsen *et al.*, 1997), una inicial rápida con una cinética de primer orden, a la que sigue una etapa de degradación lenta de orden cero. La diferencia entre las constantes de velocidad de ambas fases está aproximadamente en relación 3:1. Esta sucesión de cinéticas en la biodegradación del LAS puede estar motivada por su agotamiento en la primera fase, por lo que la existencia de una segunda etapa correspondería a la degradación de determinados metabolitos más refractarios. También puede deberse a



que, al tratarse de un ensayo realizado en discontinuo, se produjera durante la degradación el agotamiento de otros co-sustratos o nutrientes (N y P) que fueran necesarios para el crecimiento de las poblaciones microbianas.

**Tabla 3.3. Parámetros cinéticos de la degradación del LAS como única fuente de carbono en distintos medios.**

	Medio	[LAS] <sub>0</sub> (ppm)	T (°C)	t <sub>1/2</sub> (d)	Referencia
LAS	agua de río	4.05		0.4	Moreno <i>et al.</i> , 1998
LAS	agua de río	2.1		0.6	Moreno <i>et al.</i> , 1998
LAS	agua estuárica	0.02	20	6.9	Shimp, 1989
LAS	agua de mar	20	22	6-9	Vives-Rego <i>et al.</i> , 1987
LAS	agua de mar	10	20-25	6-7	Sales <i>et al.</i> , 1987
LAS	agua de mar	5	20	4-9	Vives-Rego <i>et al.</i> , 2000
C <sub>10</sub> -C <sub>13</sub> LAS	lodos activos	5		1.5-2.2	Larson <i>et al.</i> , 1993
C <sub>10</sub> -C <sub>13</sub> LAS	agua de río	10		1-11	Knepper y Kruse, 2000
C <sub>10</sub> -C <sub>13</sub> LAS	agua de río	0.005-5	20	0.9-1.3	Larson <i>et al.</i> , 1993
C <sub>10</sub> -C <sub>13</sub> LAS	agua subterránea	20		7-346	Krueger <i>et al.</i> , 1998
C <sub>10</sub> LAS	agua de río	5		3.4	Hsrak 1996
C <sub>10</sub> LAS	agua de río	5		1.46	Moreno <i>et al.</i> , 1998
C <sub>12</sub> LAS	agua de río	5		0.96	Moreno <i>et al.</i> , 1998
C <sub>13</sub> LAS	lodos activos	0.020		1.2	Shimp y Larson, 1996
C <sub>14</sub> LAS	agua río	5		0.49	Moreno <i>et al.</i> , 1998

El ajuste de los datos experimentales a una cinética de primer orden se ha aplicado con éxito en experimentos realizados en el laboratorio, aunque la extrapolación de las constantes cinéticas obtenidas al medio natural es cuestionable, principalmente por la alteración que se produce en las poblaciones bacterianas durante el desarrollo de los ensayos. Además, otros autores han ajustado la mineralización del LAS en suelos a una cinética de orden 3/2 (Dörfler *et al.*, 1996), o de orden variable en ensayos realizados con agua de mar (Quiroga *et al.*, 1989).

Quiroga *et al.*, (1989) establecieron un modelo cinético para la biodegradación primaria del LAS en agua de mar en ensayos realizados en discontinuo, en el que la expresión general de la ecuación de velocidad del proceso viene dada por:

$$-\frac{\partial C}{\partial t} = K_2 \cdot C^2 + K_1 \cdot C + K_0$$

donde  $C$  es la concentración de LAS en el agua,  $t$  el tiempo en días; y  $K_0$ ,  $K_1$  y  $K_2$  son parámetros de ajuste. Los valores de estos parámetros, cuando  $C$  se expresa en  $\mu\text{g}$  y el tiempo en días, son, por ejemplo para 20 y 25°C, los siguientes:

$$K_2 = -4.72 \times 10^{-4}, K_1 = 0.28 \text{ y } K_0 = -17.06 \quad (20^\circ\text{C})$$

$$K_2 = -4.78 \times 10^{-4}, K_1 = 0.28 \text{ y } K_0 = -0.28 \quad (25^\circ\text{C})$$

El buen ajuste de la velocidad de degradación ( $dC/dt$ ) a un polinomio de segundo grado con respecto a la concentración, implica que la variación de  $C$  con  $t$  tiene forma sigmoideal, y por tanto la degradación en agua de mar, en las condiciones ensayadas por estos autores, incluye tres fases: una primera fase de adaptación de la flora bacteriana presente en el medio, durante la cual la concentración de LAS no varía apreciablemente, una segunda fase de desarrollo exponencial de la población bacteriana en la que se produce la degradación de un modo efectivo, y una fase final en la que se llegaría una concentración residual de sustrato, a la vez que se produce un estacionamiento en el crecimiento de organismos.

La heterogeneidad de los resultados obtenidos hasta la fecha para la degradación del LAS en los medios marino y estuárico, da idea de la complejidad del proceso y la multitud de variables que inciden sobre él. En general, los factores que pueden explicar las diferentes cinéticas de biodegradación detectadas en los ensayos realizados hasta la fecha son numerosos, aunque quizás las variaciones en la densidad y aclimatación al LAS de la flora bacteriana sea la más relevante (Swisher, 1987; Vives-Rego *et al.*, 1987; Ginkel, 1996). También pueden influir otros factores, como la reducción de biodisponibilidad del LAS -al precipitar como sal cálcica o magnésica cuando se trabaja en agua de mar o al adsorberse sobre determinadas superficies-, la presencia de otros metabolitos más biodegradables y la limitación de nutrientes, especialmente fósforo y nitrógeno (Vives-Rego *et al.*, 1992). Estas variaciones dificultan también la modelización del proceso, especialmente cuando se pretende simular las condiciones ambientales.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Los objetivos concretos planteados para el estudio sobre la biodegradación del LAS fueron los siguientes:

1. Establecer la cinética de la biodegradación primaria del LAS utilizando homólogos e isómeros puros a concentraciones ambientales.
2. Comparar la cinética de biodegradación de homólogos de distinta longitud de cadena ( $C_{11}$ LAS y  $C_{12}$ LAS).
3. Determinar la existencia de los SPC procedentes de la degradación del LAS y evaluar la evolución de su concentración a lo largo del tiempo.
4. Evaluar el efecto de la temperatura y la presencia de microorganismos adaptados al LAS en el proceso global de su biodegradación.

### 3.2. MATERIAL Y MÉTODOS

Los ensayos de degradación se realizaron en discontinuo con agua de mar procedente del océano Atlántico y concentraciones de LAS similares a las que pueden encontrarse en sistemas costeros. De manera previa a la realización sistemática de los bioensayos, se probaron recipientes de distinto volumen y composición, así como distintos sistemas de homogeneización del agua en el reactor. Todos los ensayos se realizaron en condiciones aeróbicas y a temperatura controlada.

#### 3.2.1. Naturaleza del LAS y características del agua de mar

El índice activo y la distribución de homólogos, expresados en porcentaje, de los homólogos de LAS utilizados en los ensayos de biodegradación se indica en la tabla 3.4. En la tabla 3.5 se muestra la distribución de isómeros de los homólogos C<sub>11</sub>LAS y C<sub>12</sub>LAS utilizados. Todos los homólogos de LAS han sido suministrados por Petroquímica Española S.A.

**Tabla 3.4. Distribución de homólogos de los distintos C<sub>11</sub>LAS y C<sub>12</sub>LAS utilizados, expresada como porcentaje en peso. (I o II: homólogo constituido por una mezcla de isómeros y un bajo contenido en otros homólogos, P: homólogo con predominancia de un sólo isómero).**

Índice		Distribución homólogos (%)				
Activo (%)						
		C <sub>10</sub>	C <sub>11</sub>	C <sub>12</sub>	C <sub>13</sub>	C <sub>14</sub>
C <sub>11</sub> LAS I	47.0	-	94.9	5.1	-	-
C <sub>11</sub> LAS P	15.05	-	98.7	1.3	-	-
C <sub>12</sub> LAS I	5.0	-	6.3	92.1	1.6	-
C <sub>12</sub> LAS II	42.0	-	1.3	97.5	0.4	-
C <sub>12</sub> LAS P	33.0	-	0.1	98.9	0.4	-

**Tabla 3.5. Composición isomérica de los distintos C<sub>11</sub>LAS y C<sub>12</sub>LAS utilizados, expresada como porcentaje en peso.**

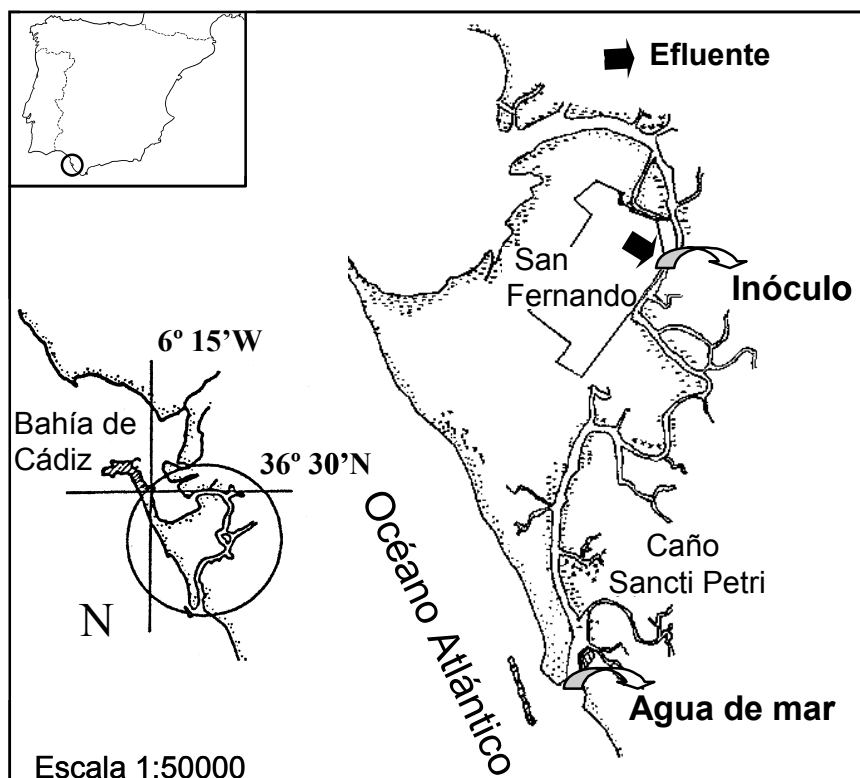
Patrón	Pureza (%)	Composición isomérica (%)			
		2φ	3φ	4φ	5φ
C <sub>11</sub> LAS I (*)	94.9				
C <sub>11</sub> LAS P	98.7	10.8	73.8	13.3	0.8
C <sub>12</sub> LAS I	92.1	39.7	38.7	11.6	2.1
C <sub>12</sub> LAS II(*)	97.5				
C <sub>12</sub> LAS P	99.5	86.8	12.1	0.6	-

(\*)Composición isomérica desconocida

El contenido en DATS y LAS ramificados es inferior al 1%, y por tanto, su contribución es despreciable. El contenido en estos coproductos del LAS es mucho menor que el de los homólogos utilizados por otros autores, que contenían entre un 6 y un 8% en peso de DATS, por lo que pudieron detectar sus intermedios de degradación (Di Corcia *et al.*, 1999a) y un 3-6% de LAS ramificados (Nielsen *et al.*, 1997; Kölbener *et al.*, 1995). Los homólogos de LAS utilizados se han producido en España utilizando el ácido fluorhídrico como catalizador, con este proceso de producción se reduce el porcentaje de impurezas presentes en el producto comercial (Smith, 1997).

Cada ensayo de degradación se ha denominado con una letra mayúscula (A, B, C, D, E y F), en cada ensayo se han realizado experimentos comparando una o varias variables(distintos casos) que se describirán posteriormente. Los ensayos de biodegradación se han realizado utilizando agua e inóculos marinos naturales, y se iniciaron inmediatamente después de la toma de muestras (<2h). El agua de mar se tomó en la boca sur del caño de Sancti Petri durante la pleamar (Fig. 3.2), que es un área poco contaminada (González-Mazo *et al.*, 1997b). El inóculo se tomó en otro punto de este mismo caño (Fig. 3.2), cerca del efluente de aguas residuales no depuradas de la ciudad de San Fernando (Cádiz), donde existe una intensa actividad microbiana con cepas adaptadas a la contaminación de origen urbano. Las principales propiedades del agua de mar y del inóculo se muestran en la tabla 3.6a y 3.6b. Las concentraciones de LAS y SPC en el inóculo son altas, del orden de  $10^3 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  y  $150 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  respectivamente. No obstante el aporte de LAS y SPC es irrelevante en el balance general de biodegradación,

puesto que se diluye unas 250 veces, y representan menos del 2% del LAS adicionado al principio del experimento.



**Figura 3.2.** Mapa del caño de Sancti Petri (bahía de Cádiz) mostrando la ubicación de los puntos donde se tomaron el agua y el inóculo utilizados en los ensayos de biodegradación, así como del punto de vertido de aguas residuales de la ciudad de San Fernando (efluente).

Más del 90% de las bacterias marinas no son cultivables en medios estándar (Servais *et al.*, 1992; Barcina *et al.*, 1997). Por tanto, el uso de agua e inóculos naturales es recomendable para simular adecuadamente las condiciones reales de este sistema, siendo claramente ventajosa esta práctica frente a los cultivos bacterianos puros o enriquecidos. Gerike y Fisher (1981) plantearon incluso que la utilización de inóculos previamente adaptados puede alterar el proceso de biodegradación, al cambiar la composición original de la comunidad bacteriana.

**Tabla 3.6a. Caracterización del agua utilizada en los distintos ensayos de biodegradación. (Cada serie de ensayos se indica con una letra mayúscula).**

	ENSAYO				
	A	B	C	D y E	F
Fecha	4/5/99	20/5/99	1/7/99	5/1/2000	16/3/2000
Salinidad	37.704	37.750	35.063	35.998	36.966
pH (SWS)	8.06	7.79	7.95	8.21	8.12
Alcalinidad (mM)	2.57	2.50	2.35	3.08	2.82
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (μM)	2.78	1.56	0.37	0.89	1.03
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (μM)	4.69	5.96	0.88	2.29	3.01
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (μM)	0.86	0.12	0.26	0.64	0.74
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (μM)	0.23	0.29	0.08	0.20	0.21
SiO <sub>2</sub> (μM)	6.87	3.29	1.22	4.80	4.50
ΣLAS (μg·L <sup>-1</sup> )	25	5	35	55	30
C <sub>12</sub> LAS (μg·L <sup>-1</sup> )	8	2	14	17	12
ΣSPC(μg·L <sup>-1</sup> )	6	<1	5	<1	<1

**Tabla 3.6b. Caracterización del inóculo utilizado en los distintos ensayos de biodegradación, indicando el aporte extra de LAS y SPC procedente del inóculo en cada ensayo.**

	ENSAYO				
	A	B	C	D y E	F
Fecha	4/5/99	20/5/99	1/7/99	5/1/2000	16/3/2000
ΣLAS (μg·L <sup>-1</sup> )	2506	210	5230	9650	3125
C <sub>12</sub> LAS (μg·L <sup>-1</sup> )	854	60	1688	2510	1034
ΣSPC (μg·L <sup>-1</sup> )	85	12	150	57	102

### 3.2.2. Selección del reactor aeróbico

La selección del reactor aeróbico se realizó comparando los resultados de tres reactores estáticos de distinta capacidad: un microcosmos de PVC de 120L de capacidad, un erlenmeyer de polipropileno de 2.5L y una botella de vidrio de 3L. En los tres casos el experimento se desarrolló en oscuridad para evitar la proliferación de

fitoplancton, con agitación, aireación forzada y una temperatura constante. Los reactores de menor volumen se mantuvieron en una cámara termostatzada ( $\pm 0.2^{\circ}\text{C}$ ), con saturación de  $\text{O}_2$  insuflando aire a través de una pipeta Pasteur mediante una bomba electrosoplante y se homogeneizaron continuamente con un agitador magnético. En la figura 3.3a se muestra un esquema de la disposición de estos reactores. La agitación del microcosmos (Fig. 3.3b) se realizó utilizando tres bombas sumergibles que proporcionaban un alto caudal ( $17 \text{ L}\cdot\text{minuto}^{-1}$ ) y que simultáneamente insuflaban aire, manteniendo la disolución saturada en oxígeno. La temperatura en este caso se mantuvo constante con una resistencia sumergible controlada por un termopar. La precisión en el control de la temperatura fue de  $\pm 1^{\circ}\text{C}$ . La concentración inicial de LAS en estos ensayos previos fue de  $500 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . El uso de un microcosmos de gran volumen tiene ventajas claras para la simulación de condiciones ambientales, ya que permite muestrear mayores volúmenes (250mL) y reducir, por tanto, el límite de detección, así como el efecto de confinamiento sobre los microorganismos. Sin embargo a pesar de los esfuerzos para homogeneizar el microcosmos, se constató la imposibilidad –en las condiciones ensayadas- de obtener muestras, de forma reproducible, cuya concentración de LAS fuera representativa de todo el volumen. Además también se detectaron pérdidas importantes por adsorción en las paredes del recipiente. Este hecho se ilustra en la figura 3.4, donde se muestra la evolución de la concentración de  $\text{C}_{12}\text{LAS}$  en un experimento con inóculo y su control correspondiente, en un ensayo realizado en el microcosmos. Estos datos corresponden al ensayo A, que se describirá en el siguiente apartado de este capítulo. Como se puede apreciar en la figura 3.4, la reducción de la concentración del homólogo de LAS después de unas horas en el control es significativa ( $>20\%$ ), y se han detectado variaciones anómalas en estos datos con el tiempo, lo que indica que las muestras tomadas de este reactor no son representativas. Estas pérdidas por adsorción se produjeron también en el erlenmeyer de plástico (20% adsorción del LAS añadido). Por este motivo, se decidió realizar de manera sistemática los bioensayos en reactores de vidrio de 3L de capacidad. En ellos las pérdidas de LAS por adsorción fueron inferiores al 10% en todos los casos.



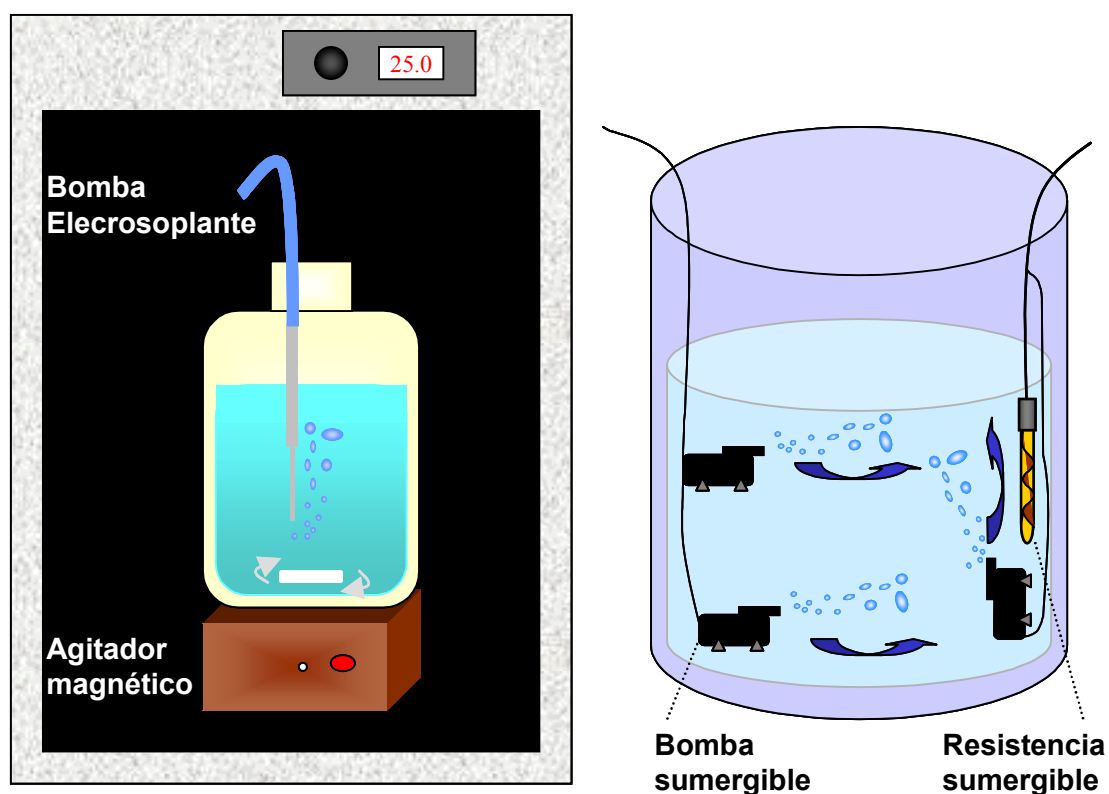


Figura 3.3. Esquema de los reactores comparados en los ensayos previos de biodegradación. (a) Microcosmos (120L de capacidad) de plástico. (b) Reactor de menor volumen correspondiente al dispositivo utilizado tanto con el erlenmeyer de plástico (2.5L de capacidad) y el reactor de vidrio (3L).

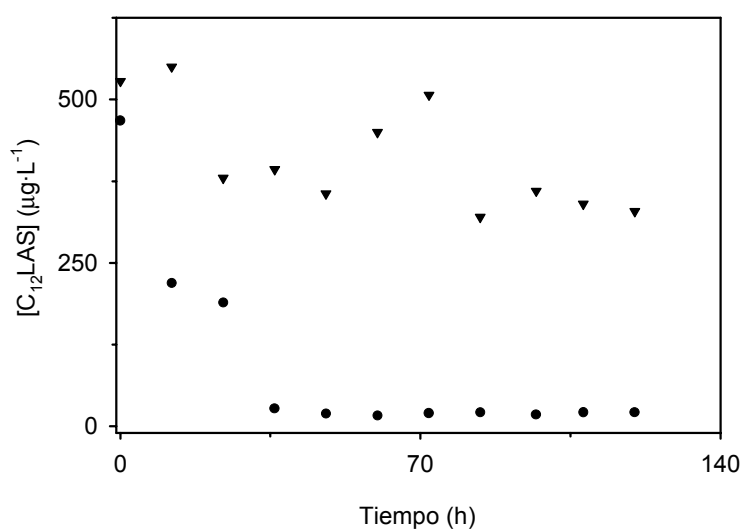


Figura 3.4. Variación de la concentración de C<sub>12</sub>LAS con el tiempo en el ensayo de degradación A (●) y en su control (▼). Este ensayo se realizó en el microcosmos, y sus principales características se describen en el siguiente apartado de la memoria.

### 3.2.3. Ensayos de biodegradación realizados y sistemática de muestreo

Las principales características de cada serie de ensayos, denominados con una letra mayúscula, se recogen en la tabla 3.7. En ella se muestran los homólogos utilizados, la concentración nominal inicial del compuesto (homólogo adicionado de LAS o SPC), la concentración total de LAS y SPC aportada por el agua y el inóculo (aporte adicional), el porcentaje en peso que representa el C<sub>12</sub>LAS adicional respecto al total, la temperatura y la duración. Con este diseño de los experimentos se estudió la influencia del inóculo (ensayos B y C), de la temperatura (ensayos D y E) y de la composición de LAS sobre la biodegradación (varios ensayos).

**Tabla 3.7. Principales características de las series de ensayos realizados, incluyendo los homólogos empleados, la concentración nominal inicial (concentración de homólogo adicionado por litro de disolución), la temperatura, la duración, así como las concentraciones de LAS y SPC y el porcentaje en peso de C<sub>12</sub>LAS con el que contribuyen el agua y el inóculo (adicional) en cada caso.**

	A	B <sup>(3)</sup>	C <sup>(3)</sup>	D	D	F
Compuesto ensayado	C <sub>12</sub> LAS I	C <sub>12</sub> LAS I	C <sub>12</sub> LAS I C <sub>11</sub> LAS I	C <sub>12</sub> LAS II C <sub>11</sub> LAS P	C <sub>12</sub> LAS II C <sub>11</sub> LAS P	C <sub>12</sub> LAS P C <sub>11</sub> LAS P C <sub>11</sub> SPC 5φC <sub>5</sub> SPC
Concentración nominal inicial (μg·L <sup>-1</sup> )	500	2000	2000	1000	1000	1000
Concentración LAS adicional (μg·L <sup>-1</sup> ) <sup>(1)</sup>	35	9	56	93.6	93.6	42
Concentración SPC adicional (μg·L <sup>-1</sup> ) <sup>(1)</sup>	6	<1	6	<1	<1	<1
Porcentaje de C <sub>12</sub> LAS adicional <sup>(2)</sup>	2.2	0.1	1.0	2.6	2.6	1.6
T (°C)	28	25	25	25	10	25
Duración(h)	160	200	450	500	1000	725

<sup>(1)</sup> Concentración de LAS o SPC aportado por el agua de mar y el inóculo al inicio del ensayo (no incluido en la concentración nominal)

<sup>(2)</sup> Porcentaje en peso que representa el C<sub>12</sub>LAS contenido en el agua de mar y el inóculo respecto al total

<sup>(3)</sup> Ensayos realizados tanto con inoculación como sin inoculación, el resto de ensayos se realizaron todos con inóculo.

Todos los ensayos se realizaron por duplicado -excepto el ensayo A realizado en el microcosmos y un caso ensayo C en el que se utiliza el C<sub>11</sub>LAS como sustrato), y con un control abiótico preparado del mismo modo pero adicionando formaldehído (4%v/v de formaldehído al 37%). El objetivo que se pretendía conseguir con estos controles era estimar la reducción de la concentración de LAS por procesos fisicoquímicos (adsorción, precipitación,...), ajenos a la propia biodegradación.

En los ensayos B y C se evaluó la influencia de la presencia o ausencia de inóculo en la degradación del LAS, y el resto de ensayos fueron realizados todos adionando un inóculo. El efecto de la temperatura, y por tanto de la estacionalidad, se ha analizado comparando la degradación a dos temperaturas extremas en el agua de mar de sistemas litorales situados a latitudes similares a la de la bahía de Cádiz. El experimento D se desarrolló a una temperatura de  $25\pm0.2^{\circ}\text{C}$ , como valor límite del periodo estival, y el experimento E a  $10\pm0.2^{\circ}\text{C}$ , representando el caso extremo invernal. El agua y el inóculo fueron idénticos en ambos casos, para evitar diferencias entre los ensayos ajenas a la temperatura.

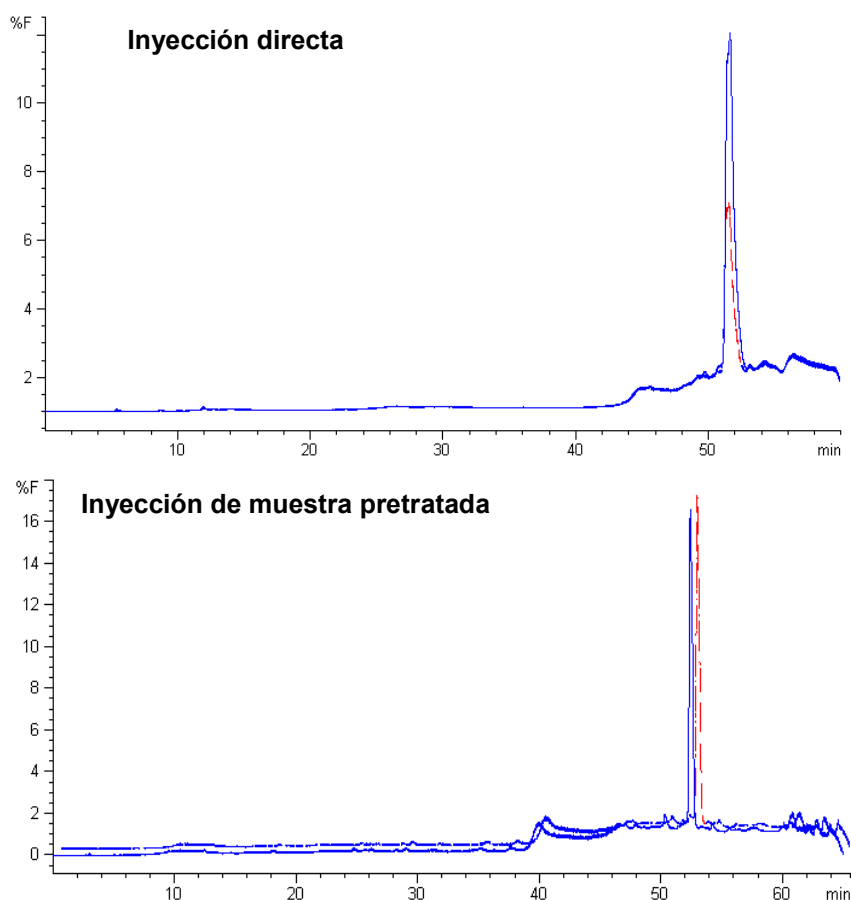
En la serie F se han incluido ensayos con el C<sub>11</sub>SPC y el 5φC<sub>5</sub>SPC, que servirán para estimar la cinética de la oxidación de la cadena carboxílica, y determinar como se producen determinadas etapas intermedias de la degradación del LAS, a través de la detección de distintos intermedios de degradación.

En cada reactor se adicionó la alícuota del homólogo correspondiente y en su caso, el inóculo (10 mL) o el formaldehído (100mL en los controles), enrasando posteriormente con agua de mar hasta alcanzar un volumen final de 2.5 L. Las muestras de agua no se filtraron por 2μm, ya que hubiera retirado los protozoos de la disolución afectando a la cinética del proceso como indicaron Vives-Rego *et al.*, (2000).

#### **3.2.4. Análisis del LAS y los SPC en los reactores aeróbicos**

Para la caracterización del proceso de biodegradación con concentraciones elevadas de LAS, se ha realizado la inyección directa de la muestra en el cromatógrafo de líquidos (Knepper y Kruse, 2000). En esta memoria en ensayos previos (concentración inicial de C<sub>12</sub>LAS de 10ppm) se tomaron muestras de 1 mL a lo largo del experimento y se realizó la inyección directa (50 μL) en el cromatógrafo. Aunque los

resultados fueron aparentemente aceptables, ya que se pudo hacer un seguimiento completo de la degradación (LAS y SPC), se constató la mala reproducibilidad de este procedimiento, como muestran los cromatogramas obtenidos para dos duplicados (Fig. 3.5a). La obtención de una muestra representativa se ve dificultada por la acusada actividad superficial del LAS y la baja concentración a la que se pretendía realizar los ensayos (10 veces inferior a la utilizada en estos ensayos previos). Por ello se consideró necesaria la preconcentración de las muestras a partir de un volumen relativamente elevado (50mL) antes de su análisis por HPLC. Con ello se obtiene muy buena reproducibilidad, y por tanto una muestra representativa del reactor (Fig. 3.5b). No obstante, la inyección directa de la muestra que supone un acortamiento muy notable del tiempo de análisis, es útil para obtener una información cualitativa del grado de avance de la biodegradación. En este sentido se ha utilizado en este trabajo de manera auxiliar para establecer la secuencia temporal de muestreo y determinar el final de cada ensayo de degradación.



**Figura 3.5. Cromatogramas obtenidos para duplicados de muestras inyectadas directamente del reactor (a), tomando 1mL de muestra e inyectando 100 $\mu$ L, y para muestras sometidas a un tratamiento previo de concentración y purificación (b).**

En general las muestras se tomaron reduciendo la frecuencia de muestreo conforme transcurría el ensayo. Las muestras de agua (50mL en reactores de 3L) se fijaron con formaldehído (4%), y se mantuvieron a 4°C hasta que fueron analizadas. Todas las muestras se trataron siguiendo el procedimiento propuesto en la presente memoria para la determinación de LAS y SPC descrito en el capítulo 2. La cuantificación de las muestras se realizó utilizando patrones externos en agua de mar.

### **3.2.5. Recuento de microorganismos**

La población total de bacterias heterótrofas se ha estimado para cada caso y por duplicado a lo largo de todo el ensayo. Se tomaron muestras representativas del medio (1mL), se cultivaron porciones diluidas (10 $\mu$ L de cada una de ellas) en Marine Agar 2216 (Difco) durante 48h a 35°C (Del Valls et al., 1996). El número de bacterias se determinó por el método de recuento del número total de células viables (Buck, 1979). Todos los recuentos se realizaron por duplicado.

En algunos casos se procedió al aislamiento e identificación de los microorganismos presentes en los ensayos, mediante el análisis de los ácidos grasos metil éster (FAME) totales de la célula, utilizando el sistema MIDI, según los protocolos de cultivo en medio sólido y las especificaciones instrumentales recomendadas por el fabricante (Microbial Identification System, Inc., Delaware, EEUU). La base de datos empleada fue la Sherlock Standard Aerobe Database. La identificación se realizó en el Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (CSIC).

### 3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.3.1. Biodegradación primaria del LAS

En las figuras 3.6 (a-e); 3.7(a-d) y 3.8(a,b) se presenta la evolución de la concentración de C<sub>11</sub>LAS y C<sub>12</sub>LAS en los distintos ensayos de biodegradación realizados (A, B, C, D, E y F). En cada figura se muestran los duplicados obtenidos para cada experimento y el control, realizado del mismo modo que los duplicados, pero adicionando un 4% de formaldehído. Los resultados de los experimentos incluidos en cada ensayo son comparables entre sí, puesto que se realizaron en las mismas condiciones. Sin embargo la comparación entre experimentos de ensayos distintos ha de hacerse con reservas, al menos en lo que a cinética se refiere, puesto que difieren tanto en las características del agua utilizada como en las del inóculo.

De manera general, al comienzo de todos los ensayos se ha detectado una reducción de la concentración de LAS. Esta disminución es en la mayoría de los casos inferior al 10% del LAS añadido, y se produce tanto en las muestras como en los controles abióticos, por lo que su justificación debe buscarse exclusivamente en un proceso fisicoquímico, como es la adsorción. De hecho, esta reducción de la concentración se ha observado fundamentalmente en las primeras 12h del ensayo, duración similar al tiempo necesario para que se alcance el equilibrio de adsorción. Los controles abióticos no mostraron una desaparición significativa de LAS después de esta reducción inicial, por lo que cabe concluir que, bajo las condiciones experimentales utilizadas, el único proceso responsable de la retirada de LAS debe ser la biodegradación. En todos los experimentos se ha detectado también un periodo de aclimatación de los microorganismos (fase de latencia) a las condiciones específicas del ensayo durante el cual la disminución de la concentración de LAS es poco apreciable o inexistente.

A continuación se van a presentar los modelos cinéticos aplicados a los datos obtenidos en estos ensayos, y posteriormente se discutirá sobre el efecto de cada una de las variables estudiadas en la degradación del LAS.

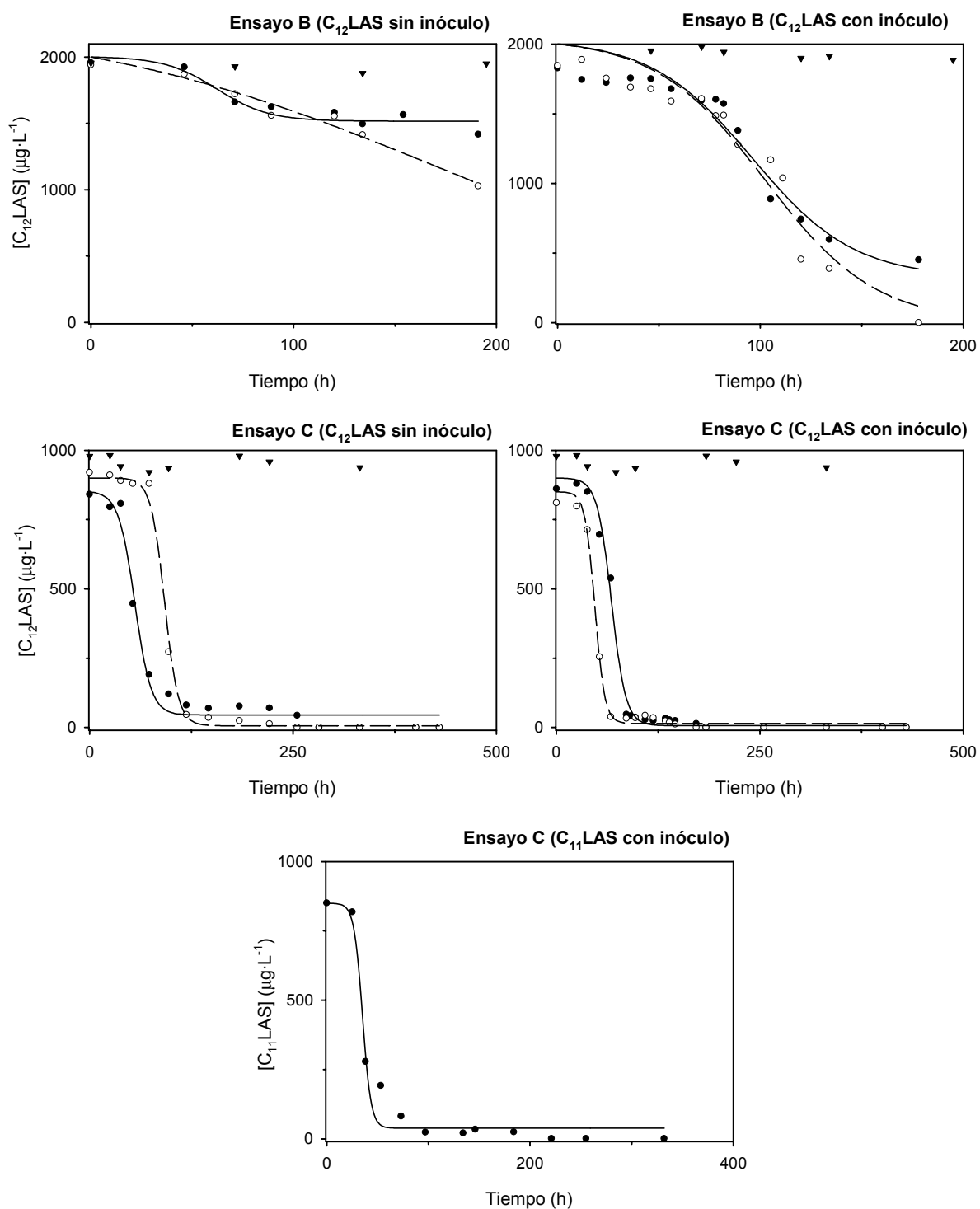


Figura 3.6. Variación de la concentración del homólogo de LAS con el tiempo en los ensayos B y C, realizados sin adición de inóculo y con adición de inóculo. En cada gráfica se muestran los duplicados (●, ○) y sus correspondientes ajustes al modelo cinético de orden variable, que se describirá en el apartado A de este mismo epígrafe, así como los valores obtenidos para el control (▼) en cada caso.

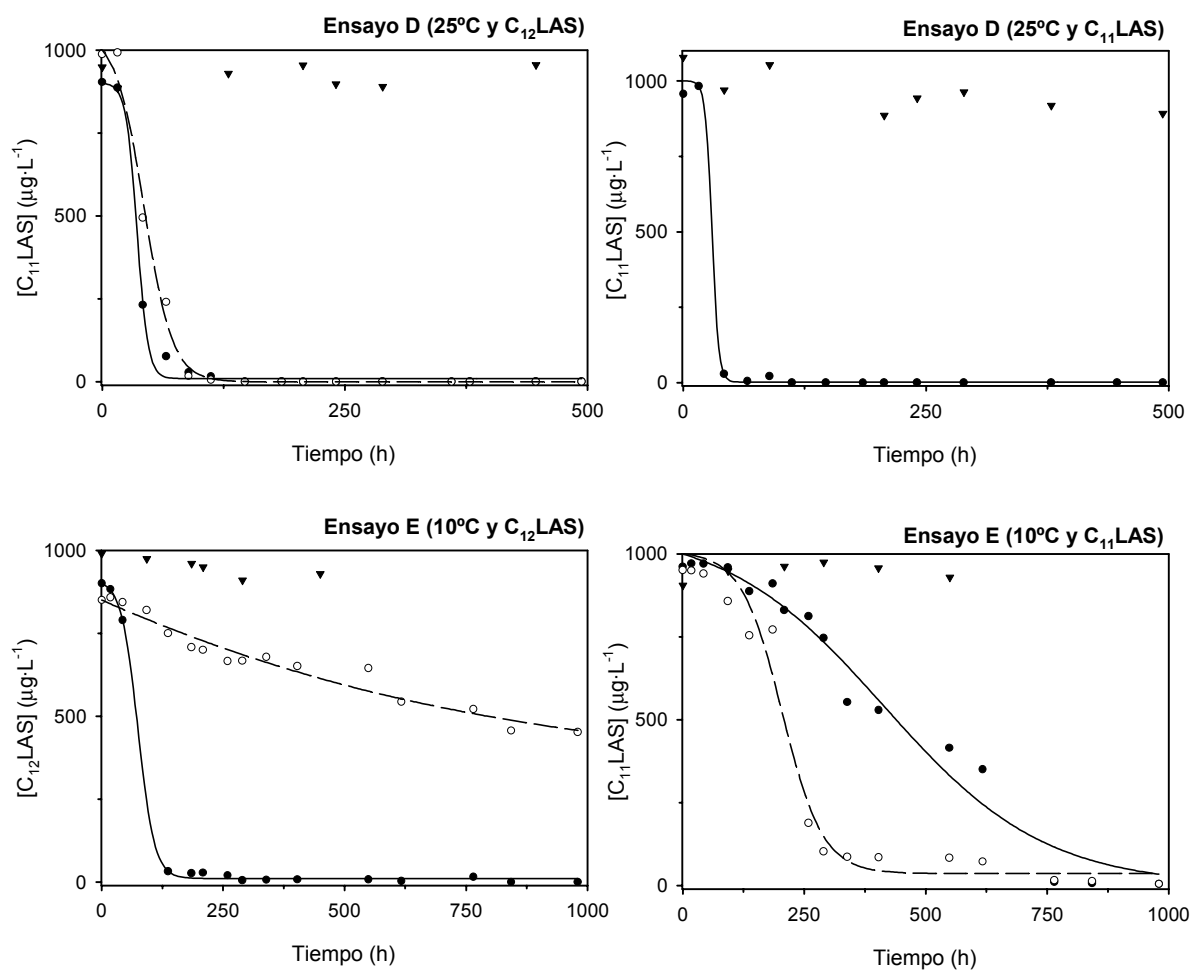
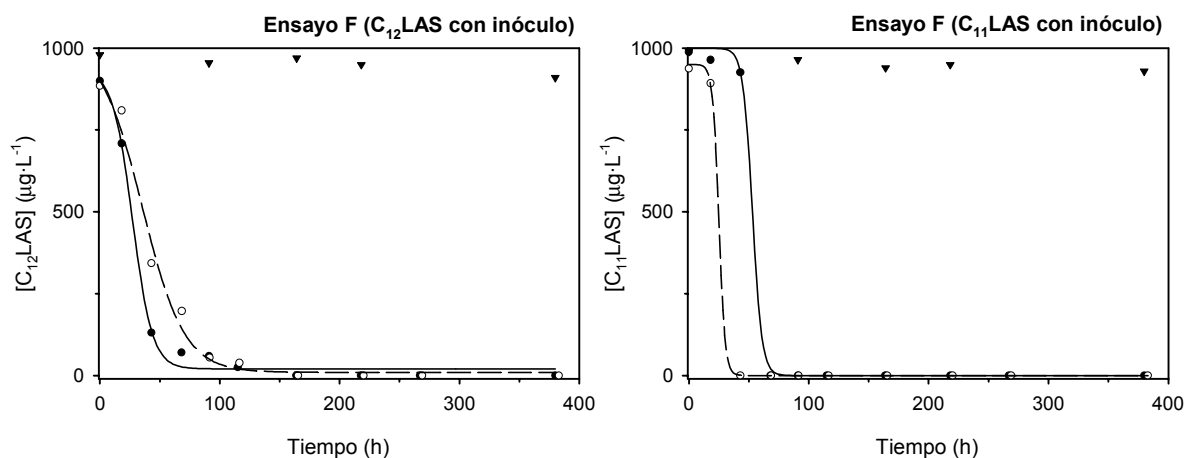


Figura 3.7. Variación de la concentración del  $\text{C}_{12}\text{LAS}$  y del  $\text{C}_{11}\text{LAS}$  en los ensayos D (25°C), y E (10°C). En cada gráfica se muestran los duplicados (●, ○) y sus correspondientes ajustes al modelo cinético de orden variable, que se describirá en el apartado A de este mismo epígrafe, así como los valores obtenidos para el control (▼) en cada caso.





**Figura 3.8.** Variación de la concentración del C<sub>12</sub>LAS (a) y del C<sub>11</sub>LAS(b) en el ensayo F, realizado con los homólogos que contienen un mayor porcentaje de un determinado isómero, a 25°C y con inóculo. En cada gráfica se muestran los duplicados (●, ○) y sus correspondientes ajustes al modelo cinético de orden variable, que se describirá en el apartado A de este mismo epígrafe, así como los valores obtenidos para el control (▼) en cada caso.

### A. Cinética de la degradación primaria del LAS

Los ajustes cinéticos utilizados en esta memoria se basan en la evolución de la concentración de sustrato con el tiempo, sin tener en cuenta directamente la evolución de la población bacteriana. Todos los ajustes estadísticos se han realizado utilizando las aplicaciones del programa *SigmaPlot 4.0*.

La biodegradación primaria supone la desaparición del LAS como molécula y su transformación en distintos intermedios de degradación. Como primera aproximación, se ha ajustado el porcentaje de biodegradación de LAS frente al tiempo (t), según una reacción de primer orden, una vez transcurrida la fase de latencia (L). La expresión de ajuste es la siguiente:

$$\begin{aligned} LAS_{\text{degradado}} (\%) &= 0 & t \leq L \\ LAS_{\text{degradado}} (\%) &= A \cdot e^{-k \cdot t} & t > L \end{aligned} \quad (1)$$

donde A representa el porcentaje de biodegradación alcanzado al final del ensayo, y k es la constante cinética de la reacción de primer orden (h<sup>-1</sup>) con el tiempo expresado en horas. El ajuste a la cinética de primer orden se ha realizado estimando gráficamente la

fase de latencia, y aplicando el ajuste de primer orden al resto de datos. A partir de la constante de primer orden ( $k$ ) se ha calculado el tiempo de vida medio ( $t_{1/2}$ ) para cada uno de los ensayos realizados, expresado como:

$$t_{\frac{1}{2}} = \ln \frac{2}{k}$$

El tiempo de vida medio representa el tiempo necesario para que se degrade el 50% del sustrato inicial. Por tanto, puesto que hemos retirado los datos de la fase de latencia para el ajuste, podemos calcular el tiempo de vida medio total ( $t_{1/2 \text{ total}}$ ) en cada experimento, que resulta de la suma del tiempo de vida medio obtenido a partir del ajuste y la fase de latencia. La aproximación a una cinética de primer orden, aunque limitada porque supone que la densidad de microorganismos permanece constante con el tiempo, es adecuada para comparar los resultados con los de otros autores.

Los datos también se han ajustado al modelo propuesto por Quiroga *et al.*, (1989), desarrollado posteriormente por Quiroga *et al.*, (1999), que explica adecuadamente cinéticas de orden variable. Aunque esta generalización parte de la información obtenida en la biodegradación del LAS, su objetivo principal era hacer aplicable este modelo a otros procesos microbianos en los que -como es el caso de la fermentación alcohólica- su estudio suele estar sustentado, además de por la variación de la concentración de sustrato con el tiempo, por una sólida información de la evolución de la biomasa responsable de su degradación. En este caso, en el que se dispone sólo de una información superficial de la variación de la cantidad de microorganismos presentes en el medio y -además- las concentraciones de sustrato (LAS) y sus variaciones son muy pequeñas, la discusión que realiza al respecto debe ser contemplada sólo en términos de una prospección cualitativa del proceso.

La ecuación diferencial de velocidad de este modelo viene dada por la siguiente expresión:

$$-\frac{\partial C}{\partial t} = K_2 \cdot C^2 + K_1 \cdot C + K_0$$

donde  $C$  es la concentración de LAS en el agua ( $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ),  $t$  es el tiempo (h); y  $K_0$ ,  $K_1$  y  $K_2$  son los parámetros de ajuste.

$$\text{Integrando, } C = \frac{h \cdot (C_0 - q) - q \cdot (C_0 - h) \cdot e^{p \cdot t}}{(C_0 - q) - (C_0 - h) \cdot e^{p \cdot t}} \quad (2) \quad \text{donde:}$$

$$p = \sqrt{K_1^2 - 4 \cdot K_2 \cdot K_0} \quad h = \frac{-K_1 - p}{2 \cdot K_2} \quad q = \frac{-K_1 + p}{2 \cdot K_2}$$

Según Quiroga *et al.*, (1999), “ $q$ ” representaría la materia orgánica no biodegradable para este microorganismo, “ $h$ ” sería la concentración máxima de materia orgánica disponible en el medio para la formación de biomasa, y “ $p$ ” la tasa de crecimiento específico de los microorganismos responsables de la biodegradación ( $\mu_{\max}$ ).

Estos ajustes se han realizado con un máximo de 300 iteraciones y aplicando como criterio de convergencia  $10^{-4}$ . El valor de  $C_0$  se ha introducido en el ajuste según la concentración inicial detectada, y los parámetros iniciales de ajuste han sido  $q = 10$ ,  $p = 0.1$  y  $h = C_0$  en todos los casos.

El coeficiente de correlación obtenido para los ajustes cinéticos de primer orden varía entre 0.80 y 0.91. Aunque este ajuste explica buena parte de la variación del proceso, no es completamente satisfactorio. Por tanto debe considerarse como una primera aproximación, ya que la cinética de biodegradación debe ser en realidad de un orden diferente. Como se puede apreciar en la tabla 3.8, los ajustes al modelo de orden variable son mejores que los de primer orden, con coeficientes de correlación ( $r^2$ ) superiores a 0.9 en todos los casos, lo que indica que este modelo cinético explica con mayor precisión la dinámica de la degradación.

Las constantes de la ecuación diferencial de velocidad ( $K_0$ ,  $K_1$  y  $K_2$ ) calculadas en cada caso se muestran en la tabla 3.8. En general las constantes son similares a las determinadas por Quiroga *et al.*, (1989) en agua de mar con una concentración inicial de LAS de unos  $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ . La constante cinética  $K_1$  es la que contribuye en mayor medida a la velocidad del proceso, lo que sugiere que la cinética de degradación del LAS es eminentemente de primer orden, aunque en ningún caso se pueden desestimar las contribuciones correspondientes al término independiente ( $K_0$ ) y de la  $K_2$ .

A continuación se va a desarrollar una discusión particularizada sobre como afectan los distintos factores al proceso de biodegradación. Para ello, se han determinado los parámetros  $p$ ,  $q$  y  $h$  de la ecuación integrada, ya que aportan información específica sobre el proceso de degradación (tasa de crecimiento de los microorganismos, sustrato no degradado y sustrato inicial, respectivamente) y pueden ayudar en la interpretación de los resultados. Los valores de  $q$  no representan

explícitamente la concentración de LAS que persiste en el medio al final del ensayo, ya que es resultado de un ajuste a la evolución general del experimento, pero nos dan idea de los niveles a los que se encuentra la concentración de LAS en la etapa final de la degradación (se puede observar directamente en las figuras 3.6, 3.7 y 3.8).

**Tabla 3.8. Constantes cinéticas de la ecuación diferencial de velocidad del modelo de orden variable obtenidas para los ensayos realizados con los homólogos del LAS.**

Ensayo	Homólogo	Inóculo	T (°C)	K <sub>0</sub>	K <sub>1</sub>	K <sub>2</sub>	r <sup>2</sup>
B	C <sub>12</sub> LAS I	No	25	9.7	0.5599	-1.60·10 <sup>-4</sup>	0.915
	"	No	25	6.7	0.0422	-1.48·10 <sup>-5</sup>	0.954
	"	Si	25	16.1	0.0480	-2.06·10 <sup>-5</sup>	0.910
	"	Si	25	18.9	0.0369	-1.80·10 <sup>-5</sup>	0.934
C	C <sub>12</sub> LAS I	No	25	11.0	0.0773	-9.42·10 <sup>-5</sup>	0.900
	"	No	25	26.6	0.1201	-1.32·10 <sup>-4</sup>	0.996
	"	Si	25	25.3	0.1152	-1.27·10 <sup>-5</sup>	0.992
	"	Si	25	37.3	0.1967	-2.40·10 <sup>-4</sup>	0.998
	C <sub>11</sub> LAS I	Si	25	43.9	0.2337	-3.11·10 <sup>-4</sup>	0.965
D	3φC <sub>11</sub> LAS	Si	25	76.8	0.3242	-3.41·10 <sup>-4</sup>	0.999
	C <sub>12</sub> LAS II	Si	25	25.9	0.1807	-2.96·10 <sup>-4</sup>	0.991
	"	Si	25	17.9	0.0682	-6.48·10 <sup>-5</sup>	0.992
E	3φC <sub>11</sub> LAS	Si	10	1.7	0.0062	-5.76·10 <sup>-4</sup>	0.962
	"	Si	10	7.1	0.0319	-3.07·10 <sup>-5</sup>	0.964
	C <sub>12</sub> LAS II	Si	10	9.7	0.0377	-3.62·10 <sup>-5</sup>	0.974
	"	Si	10	0.5	0.0051	-4.77·10 <sup>-6</sup>	0.910
F	3φC <sub>11</sub> LAS	Si	25	63.1	0.2520	-2.52·10 <sup>-4</sup>	0.999
	2φC <sub>12</sub> LAS	Si	25	27.5	0.1312	-1.36·10 <sup>-4</sup>	0.984
	"	Si	25	10.4	0.0546	-6.73·10 <sup>-5</sup>	0.929

### B. Influencia de la adición de inóculo

La presencia de inóculo (4 mL·L<sup>-1</sup>) en disolución reduce la fase de latencia aproximadamente en 24 horas, y también, por tanto, el tiempo requerido para completar la degradación (Fig. 3.9). La duración de esta etapa de aclimatación es, al menos de unas 12 horas. En algunos ensayos realizados con inóculo no se ha detectado esta etapa previa, y por tanto ha debido ser inferior a 6-12 horas (momento del segundo muestreo).

En la tabla 3.9 se recopilan las constantes cinéticas de primer orden (A, k), la fase de latencia y el tiempo de vida media (t<sub>1/2</sub>) obtenidos para los ensayos B y C, realizados con C<sub>12</sub>LAS con inoculación y sin inoculación.

**Tabla 3.9. Parámetros cinéticos de primer orden (A, k) obtenidos como media de los dos duplicados en los ensayos B y C: fase de latencia y el tiempo de vida medio ( $t_{1/2}$ ). El tiempo de vida medio total incluye la duración de la fase de latencia.**

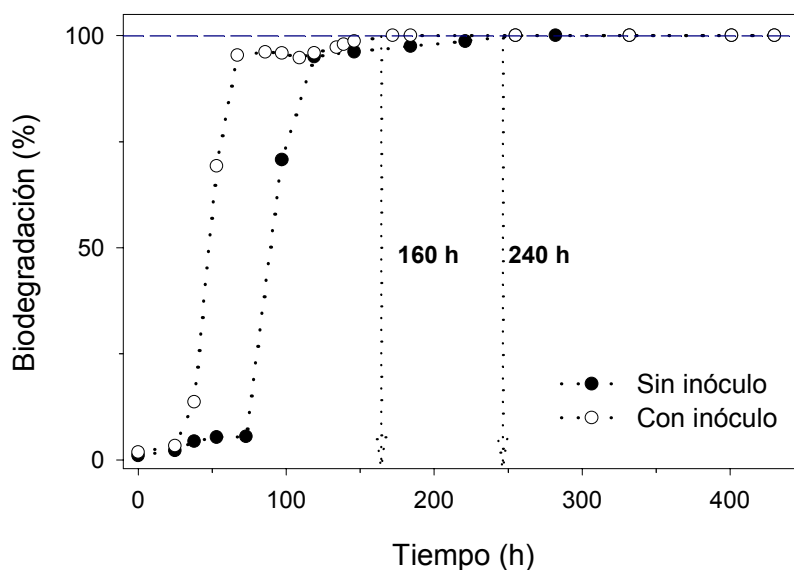
ENSAYO	Inóculo	F.latencia(h)	A (%)	K(d <sup>-1</sup> )	$t_{1/2}$ (d)	$t_{1/2}$ total(d)
B	No	35.5±14.8	46.8±11.6(*)	0.39±0.39	7.82±1.2	9.33
B	Si	12	102.3.0±1.3	0.14±0.03	4.81±0.32	5.31
C	No	25	99.5±4.9	0.40±0.16	1.88±0.74	2.92
C	Si	12.5±17.8	105.0±0.1	0.48±0.05	1.44±0.15	1.94

(\*) Este ensayo finalizó antes de que se completara el proceso de degradación.

La extensión de la biodegradación primaria del LAS es independiente de la adición de inóculo (Fig. 3.9), y ha superado el 99% en todos los casos (Tabla 3.9). Aparentemente el ensayo B sin inóculo es una excepción, pero es deducción no es real, ya que este experimento tuvo que detenerse antes de que se completara la degradación.

El tiempo de vida media total (fase de latencia+tiempo de vida media  $t_{1/2}$ ) varió entre 2.9 y 9.3 días en los experimentos realizados sin inóculo, intervalo similar al obtenido previamente por otros autores(6-9 d) en agua de mar natural (Vives-Rego *et al.*, 1987; Vives-Rego *et al.*,2000). La adición del inóculo reduce el tiempo de vida media del C<sub>12</sub>LAS entre 1 y 4 días, como consecuencia del aumento del porcentaje de microorganismos adaptados a la contaminación de origen urbano. En los experimentos realizados con inóculo se han alcanzado velocidades de degradación similares a las detectadas para aguas de origen continental (Larson y Payne, 1981; Larson *et al.*, 1993), que usualmente presentan una mayor capacidad de degradación que las marinas.

Como se puede apreciar en la figura 3.9, la degradación del LAS se desarrolla en dos etapas: la primera caracterizada por una rápida degradación, que afecta a la mayor parte del tensioactivo, y una segunda etapa, más lenta, en la que se completa la degradación. Estas dos etapas han sido descritas previamente por Nielsen *et al.*, (1997) para aguas continentales, y deben ser consecuencia de la ralentización de la degradación una vez que ya se ha oxidado la fracción más biodegradable de la mezcla inicial, y en el medio sólo restan los componentes del homólogo cuya degradación está menos favorecida -probablemente los isómeros internos (Swisher, 1987).



**Figura 3.9. Porcentaje de biodegradación primaria de  $C_{12}$ LAS con y sin inóculo a 25°C (ensayo C) partiendo de una concentración inicial de  $2\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . También se indica el tiempo en el que se completa la degradación de este homólogo en cada caso.**

La utilización de un inóculo natural es idónea en los ensayos de biodegradación del LAS, ya que no modifica la extensión de la biodegradación y reduce la duración de los ensayos.

Los parámetros de la ecuación integrada de orden variable, obtenidos a partir de la evolución de la concentración de LAS con el tiempo de los ensayos B y C, se recopilan en la tabla 3.10. La curva que definen estos parámetros se ha mostrado previamente en la figura 3.6 para cada caso, en la que se aprecia también la bondad del ajuste obtenido.

La práctica totalidad del LAS se ha degradado al final del ensayo, como muestran los valores de 'q' próximos a 0 en los distintos casos, como era de esperar según la evolución de la concentración de LAS observada (Fig. 3.6a-d). Los microorganismos marinos han sido capaces de completar la degradación sin haber recibido suplemento nutricional alguno (ensayos discontinuos), hecho que confirma su capacidad de degradación en el medio natural donde no existen este tipo de limitaciones.

En el ajuste de cinética de orden variable se confirma la mayor rapidez de la degradación del  $C_{12}$ LAS cuando se adiciona el inóculo, como indican los valores más altos de la tasa de crecimiento específica de los microorganismos ( $\rho$ ). El aumento del

**Tabla 3.10. Parámetros cinéticos obtenidos para la concentración de C<sub>12</sub>LAS en el ensayo C.  $q$  representa la porción de sustrato no degradada al final del ensayo y  $p$  es la tasa de crecimiento de los microorganismos. Estos datos corresponden a los ajustes mostrados en la figura 3.6.**

Inóculo	C <sub>0</sub> (μg·L <sup>-1</sup> )	h (μg·L <sup>-1</sup> )	q (μg·L <sup>-1</sup> )	p (h <sup>-1</sup> )	r <sup>2</sup>
No	930	937	23	0.0672	0.900
No	900	900	6	0.1074	0.996
Si	900	900	7	0.1134	0.992
Si	900	900	15	0.1895	0.998

parámetro ' $p$ ' en el ensayo C en más de un 50% de media, indica que la presencia del inóculo aumenta, en ese orden de magnitud, la velocidad de degradación del LAS. La velocidad de degradación observada es mayor que la detectada en ensayos realizados por otros autores con agua de mar (Quiroga *et al.*, 1999), e incluso con agua de río (Perales *et al.*, 1999b), a pesar de que este último medio suele presentar una mayor capacidad de degradación de sustancias xenobióticas. Esta diferencia en los resultados se debe a las altas concentraciones de LAS utilizadas por estos autores en los ensayos, que superan ampliamente las que se detectan en el medio natural, y son las responsables de la reducción en la actividad microbiana. Las concentraciones utilizadas por estos autores han podido inhibir la degradación, por la propia toxicidad del LAS sobre los microorganismos, especialmente en los ensayos realizados en agua de mar, ya que los microorganismos marinos son más sensibles ante las sustancias xenobióticas que los de origen continental (Larson *et al.*, 1993).

Los experimentos B y C se han realizado en condiciones similares, pero la velocidad de la degradación es mayor para el ensayo C. Esto se puede deber a la mayor densidad inicial (30% superior que la del ensayo B), o a la reducción de la inhibición sobre los microorganismos por parte del LAS al utilizarse una menor concentración inicial (1 μg·mL<sup>-1</sup>), que ya han descrito previamente otros autores (Terzic *et al.*, 1992b; Quiroga y Sales, 1991).

### C. Influencia de la temperatura

Los ensayos D y E se han realizado utilizando el mismo agua e inóculo, y por tanto, las diferencias detectadas son consecuencia de la distinta temperatura a que han sido expuestos. La extensión de la biodegradación primaria del C<sub>11</sub>LAS y C<sub>12</sub>LAS no está afectada por la temperatura (Tabla 3.11 y Fig. 3.10), ya que en todos los casos se ha completado esta etapa (A>98%). Estos resultados difieren aparentemente de lo expuesto previamente por otros autores (Sales *et al.*, 1987), que no detectaron biodegradación primaria del LAS a 5-10°C después de 21 días de ensayo, como consecuencia, de nuevo, de las altas concentraciones utilizadas. Por razones que se desconocen uno de los duplicados del ensayo E, realizado con C<sub>12</sub>LAS, alcanzó sólo un 55% de biodegradación después de 41 días, mientras que en el otro se completó la degradación antes de que finalizara el ensayo. Esta diferencia es la responsable de las altas desviaciones obtenidas al hacer el valor medio de ambos duplicados, pero no hay un criterio objetivo para desestimar uno de ellos.

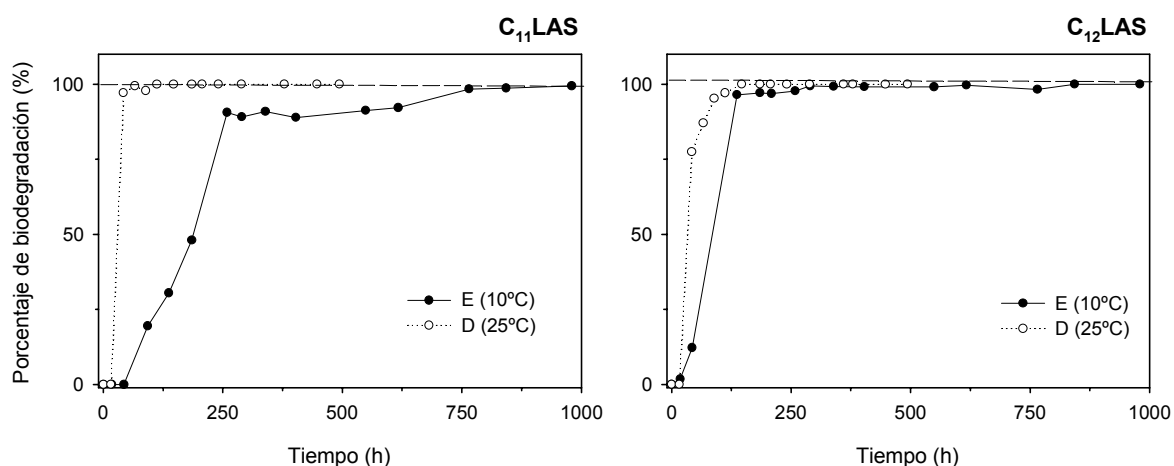
**Tabla 3.11. Constantes cinéticas primer orden (A, k), la fase de latencia y el tiempo de vida media (t<sub>1/2</sub>) para los ensayos D y E realizados a 25°C y 10°C respectivamente, tanto con C<sub>11</sub> como con C<sub>12</sub>LAS.**

Ensayo	Homólogo	T <sup>a</sup> (°C)	F.latencia (h)	A (%)	K (d <sup>-1</sup> )	t <sub>1/2</sub> (d)	t <sub>1/2</sub> total (d)
D	3φC <sub>11</sub> LAS	25	16	99.8	3.33	0.208	0.87
D	C <sub>12</sub> LAS II	25	16	100.2±1.2	0.52±0.09	1.36±0.23	2.03
E	3φC <sub>11</sub> LAS	10	66.5±33.2	103.6±1.6	0.09±0.05	9.34±5.35	12.11
E	C <sub>12</sub> LAS II	10	18	80.2±35.5	0.17±0.18	8.03±8.09	8.78

A bajas temperaturas se ralentiza la cinética de degradación, tanto para el C<sub>11</sub>LAS como para el C<sub>12</sub>LAS, corroborándose los resultados expuestos previamente por Terzic *et al.*, (1992a) en sistemas estuáricos. En estas condiciones la velocidad de todos los procesos metabólicos disminuye, y por tanto, aumenta el tiempo necesario para que los microorganismos se adapten y desarrollen el proceso de degradación.

La fase de latencia es mayor a bajas temperaturas (10°C), especialmente en los ensayos realizados con C<sub>11</sub>LAS (Fig. 5.10a), en los que han sido necesarias hasta 50h





**Figura 3.10. Porcentaje de degradación del C<sub>11</sub>LAS y del C<sub>12</sub>LAS en los ensayos D y E, realizados a 25°C y a 10°C respectivamente.**

más para que se iniciara de forma efectiva la oxidación de dicho homólogo. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Terzic *et al.*, (1992a) en aguas estuáricas, que detectaron una fase de latencia de 2 días a 14°C, y en cambio, no detectaron esta etapa a 23°C. El tiempo de vida media a 10°C supera los 8 días para ambos homólogos, y por tanto, la velocidad de degradación es entre cuatro y diez veces mayor a 25°C que a 10°C. Estos valores del tiempo de vida media están dentro del amplio intervalo (3.4-13.8 d) de los obtenidos por Vives-Rego *et al.*, (2000) en agua de mar. La disminución de actividad microbiana a 10°C afecta a todas las etapas del proceso de degradación, y especialmente, a la etapa final de degradación, que es la más lenta, como se puede observar en la figura 3.10<sup>a</sup>, sobre todo para el caso del C<sub>11</sub>LAS.

En las figuras 3.7a, 3.7b, 3.7c y 3.7d se ha representado la concentración de LAS para los distintos casos de las series D y E, así como los ajustes obtenidos con el modelo de orden variable, cuyos parámetros se muestran en la tabla 3.12. Estos parámetros confirman que, aun a baja temperatura, se completa la degradación del LAS, y que la velocidad de degradación es superior a 25°C que a 10°C para los dos homólogos estudiados. En el ensayo E las diferencias entre los duplicados son mayores que en el resto de experimentos. De hecho, uno de los duplicados del ensayo realizado con C<sub>12</sub>LAS presenta una evolución prácticamente lineal (cinética de primer orden), y a diferencia del resto de casos de la serie E no se completa la degradación después de los 42 días que duró el ensayo. La causa de esta diferencia se desconoce.

**Tabla 3.12. Parámetros cinéticos obtenidos para la concentración de C<sub>11</sub>LAS y C<sub>12</sub>LAS según el modelo cinético de orden variable, donde  $q$  representa la porción de materia orgánica no degradada al final del ensayo y  $p$  la tasa de crecimiento de los microorganismos. Estos datos corresponden a los ajustes mostrados en la figura 3.7.**

ENSAYO	Homólogo	T(°C)	C <sub>0</sub> (μg·L <sup>-1</sup> )	h (μg·L <sup>-1</sup> )	q (μg·L <sup>-1</sup> )	p (h <sup>-1</sup> )	r <sup>2</sup>
D	3φC <sub>11</sub> LAS	25	950	950	1	0.3234	0.999
D	C <sub>12</sub> LAS II	25	900	901	9	0.1750	0.991
D	C <sub>12</sub> LAS II	25	1000	1052	0	0.0682	0.992
E	3φC <sub>11</sub> LAS	10	1000	1077	0	0.0062	0.962
E	3φC <sub>11</sub> LAS	10	1000	1001	37	0.0296	0.964
E	C <sub>12</sub> LAS II	10	1000	1037	2	0.0375	0.974
E	C <sub>12</sub> LAS II	10	850	859	262	0.0027	0.910

#### **D. Influencia de la naturaleza del LAS: longitud de la cadena alquílica y composición isomérica**

En la tabla 3.13 se muestran los parámetros obtenidos para la degradación de los distintos homólogos de LAS utilizados (C<sub>11</sub>LAS y C<sub>12</sub>LAS), con la aproximación cinética de primer orden. La degradación primaria del LAS se ha completado en todos los casos al final del ensayo, tal y como han indicado también los ajustes de orden variable (Tabla 3.14). La longitud de la cadena alquílica (C<sub>11</sub> y C<sub>12</sub>) del LAS no ha afectado significativamente a la biodegradación en los distintos ensayos realizados, ni en la velocidad ni en la extensión del proceso (Tablas 3.13 y 3.14, y figuras 3.6c,d y 3.8a,b). Por tanto, cuando se determina la biodegradación en ensayos con el C<sub>11</sub>LAS y el C<sub>12</sub>LAS por separado, no hay diferencias significativas en la cinética de degradación derivadas de las diferencias en longitud de la cadena alquílica, tal y como Larson *et al.*, (1993) expusieron previamente. Sin embargo, en ensayos de degradación realizados por otros

**Tabla 3.13. Constantes cinéticas primer orden (A, k); fase de latencia y tiempo de vida media para los ensayos C con inóculo y F, realizados con C<sub>11</sub>LAS y C<sub>12</sub>LAS.**

Ensayo	Homólogo	F. latencia (h)	A (%)	K (d <sup>-1</sup> )	t <sub>1/2</sub> (d)	t <sub>1/2</sub> total (d)
C	C <sub>11</sub> LAS I	25	102.9	0.54	1.29	2.33
C	C <sub>12</sub> LAS I	12.5±17.8	105.0±0.1	0.48±0.05	1.44±0.15	1.94
F	3φC <sub>11</sub> LAS	18	104.5	0.37	1.89	2.64
F	2φC <sub>12</sub> LAS	0 (*)	101.4±0.6	0.57±0.12	1.24±0.26	1.24

(\*) La fase de latencia no se ha detectado con la secuencia de muestreo utilizada.

autores, con varios homólogos presentes de forma simultánea en el medio, se produce la biodegradación preferencial de los de cadena alquílica más larga (Swisher, 1987; Perales et al., 1999b; Terzic *et al.*, 1992a).

**Tabla 3.14. Parámetros cinéticos obtenidos para el C<sub>11</sub>LAS y C<sub>12</sub>LAS en la serie de ensayos F a partir del modelo de orden variable. Siendo  $q$  la porción de materia orgánica no degradada al final del ensayo y  $p$  la tasa de crecimiento de los microorganismos. Estos datos corresponden a los ajustes mostrados en la figura 3.8.**

Homólogo	C <sub>0</sub> (μg·L <sup>-1</sup> )	h (μg·L <sup>-1</sup> )	q (μg·L <sup>-1</sup> )	p (h <sup>-1</sup> )	r <sup>2</sup>
3φC <sub>11</sub> LAS	1000	1000.0	0	0.2520	0.999
2φC <sub>12</sub> LAS	900	932.6	13	0.1223	0.984
2φC <sub>12</sub> LAS	900	920.1	12	0.0530	0.929

La fase de latencia para ambos homólogos ha sido inferior a 25 horas en el experimento C, y a 18 horas en el ensayo F. La degradación de los homólogos de LAS en el experimento F ha sido más rápida que en ensayos anteriores, como consecuencia principalmente de la utilización de homólogos con un alto porcentaje en peso, de un isómero externo (74% de 3φC<sub>11</sub>LAS y 87% de 2φC<sub>12</sub>LAS), y probablemente también por la mayor densidad bacteriana inicial (Tabla 3.21). Los isómeros de LAS mayoritarios en los homólogos utilizados en el ensayo F son externos, cuya biodegradación está favorecida frente a los internos (Swisher, 1987). Por tanto, la degradación del resto de isómeros sería más lenta que la observada en este caso, y consecuentemente también la de la mezcla comercial. La naturaleza de los homólogos utilizados y la mayor densidad bacteriana inicial han provocado que los tiempos de vida media detectados en este ensayo sean inferiores a los del resto de casos, y a los de trabajos previos desarrollados con aguas estuáricas y marinas (Terzic *et al.*, 1992a, Vives-Rego *et al.*, 2000).

La evolución de la concentración de C<sub>11</sub>LAS y C<sub>12</sub>LAS con el tiempo obtenida en el ensayo F se ha mostrado en la figura 3.8. A pesar de su mayor velocidad de degradación al comienzo del ensayo, la degradación primaria del C<sub>12</sub>LAS se completa unas 90 horas después que la del C<sub>11</sub>LAS. Esto se debe a la ralentización de la degradación del C<sub>12</sub>LAS una vez que resta sólo el 10% de homólogo. Este porcentaje coincide con el contenido de isómeros 3φ y 4φ de este homólogo, cuya degradación está

menos favorecida que la del isómero 2 $\phi$ , pero no se tienen evidencias al respecto, ya que no se ha determinado su distribución isomérica del LAS. La diferencia en la cinética de degradación de ambos homólogos queda recogida en la menor tasa específica de crecimiento obtenida para el ensayo con C<sub>12</sub>LAS respecto a la del C<sub>11</sub>LAS. Sin embargo, el ajuste de primer orden ofrece una conclusión errónea en este sentido, ya que este tipo de ajustes no puede albergar variaciones en la velocidad de degradación a lo largo del proceso.

### **3.3.2. Contribución a la caracterización de la ruta de biodegradación del LAS**

Los intermedios de degradación generados a partir del C<sub>12</sub>LAS más abundantes tienen una cadena carboxílica par, y los del C<sub>11</sub>LAS son de cadena carboxílica impar (Tabla 3.15). Por tanto la  $\beta$ -oxidación es la principal vía responsable del acortamiento de la cadena, tal y como han expuesto previamente otros autores (Swisher, 1987; Schöberl., 1989; Schulz *et al.*, 2000; Schlenek *et al.*, 2000; Knepper y Kruse, 2000; Cook y Hrsak, 2000). Sin embargo, no se puede desestimar la existencia de la  $\alpha$ -oxidación, ya que en varios ensayos se han detectado concentraciones significativas de intermedios de degradación no generados por  $\beta$ -oxidación. La presencia de estos intermedios se ha confirmado por HPLC/MS, y como ejemplo, se muestra en la figura 3.11 un cromatograma correspondiente a la etapa final de un ensayo realizado a partir del C<sub>12</sub>LAS, en la que se ha detectado el C<sub>7</sub>SPC a concentraciones significativas. Aunque buena parte de estos ácidos sulfonilcarboxílicos puede proceder de las impurezas del propio homólogo de LAS o del aporte del agua natural o del inóculo, esta contribución no puede justificar las concentraciones detectadas en algunos casos. Por tanto, debemos concluir que la  $\alpha$ -oxidación es también una ruta posible de la degradación del LAS, tal y como indicaron previamente otros autores (Swisher, 1963; Cain *et al.*, 1972; Schöberl, 1989), aunque constituya una ruta minoritaria de degradación.

Como se puede apreciar en la tabla 3.15 la adición de inóculo o los cambios de temperatura no han afectado al mecanismo de la degradación del LAS, ya que se han detectado los mismos intermedios de degradación a partir de un determinado sustrato.

**Tabla 3.15. Intermedios de degradación principales y secundarios detectados en cada uno de los ensayos realizados, indicando la concentración máxima posible de SPC procedente de fuentes distintas al sustrato de análisis (impurezas patrón y aporte de inóculo-agua de mar naturales).**

Ensayo	Homólogo	Inoculación	[C <sub>x</sub> LAS] ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) (*)	Intermedio principal	Intermedio secundario
C	C <sub>12</sub> LAS	No	75	C <sub>6</sub> SPC, C <sub>4</sub> SPC	C <sub>7</sub> SPC, C <sub>8</sub> SPC
C	C <sub>12</sub> LAS	Si	75	C <sub>6</sub> SPC, C <sub>4</sub> SPC	C <sub>7</sub> SPC
C	C <sub>11</sub> LAS	Si	65	C <sub>5</sub> SPC, C <sub>6</sub> SPC, C <sub>7</sub> SPC	C <sub>9</sub> SPC
D	3 $\phi$ C <sub>11</sub> LAS	Si	60	C <sub>5</sub> SPC	C <sub>6</sub> SPC, C <sub>7</sub> SPC, C <sub>9</sub> SPC,
D	C <sub>12</sub> LAS	Si	65	C <sub>6</sub> SPC, C <sub>4</sub> SPC	C <sub>5</sub> SPC, C <sub>7</sub> SPC
E	3 $\phi$ C <sub>11</sub> LAS	Si	60	C <sub>5</sub> SPC, C <sub>3</sub> SPC	C <sub>6</sub> -SPC, C <sub>7</sub> SPC
E	C <sub>12</sub> LAS	Si	65	C <sub>6</sub> SPC, C <sub>4</sub> SPC	C <sub>7</sub> SPC, C <sub>8</sub> SPC
F	3 $\phi$ C <sub>11</sub> LAS	Si	25	C <sub>5</sub> SPC, C <sub>3</sub> SPC	C <sub>7</sub> SPC
F	2 $\phi$ C <sub>12</sub> LAS	Si	15	C <sub>4</sub> SPC, C <sub>6</sub> SPC	
F	C <sub>11</sub> SPC	Si	<0.1	C <sub>5</sub> -SPC, C <sub>7</sub> SPC, C <sub>3</sub> SPC	C <sub>4</sub> -SPC, C <sub>6</sub> SPC
F	5 $\phi$ C <sub>5</sub> SPC	Si	<0.1	C <sub>3</sub> SPC	-

(\*) Concentración de homólogos de LAS de distinta longitud de cadena que el homólogo objeto de estudio en cada caso, procedentes del agua e inóculo adicionados, así como de la mezcla de homólogos utilizada en el ensayo.

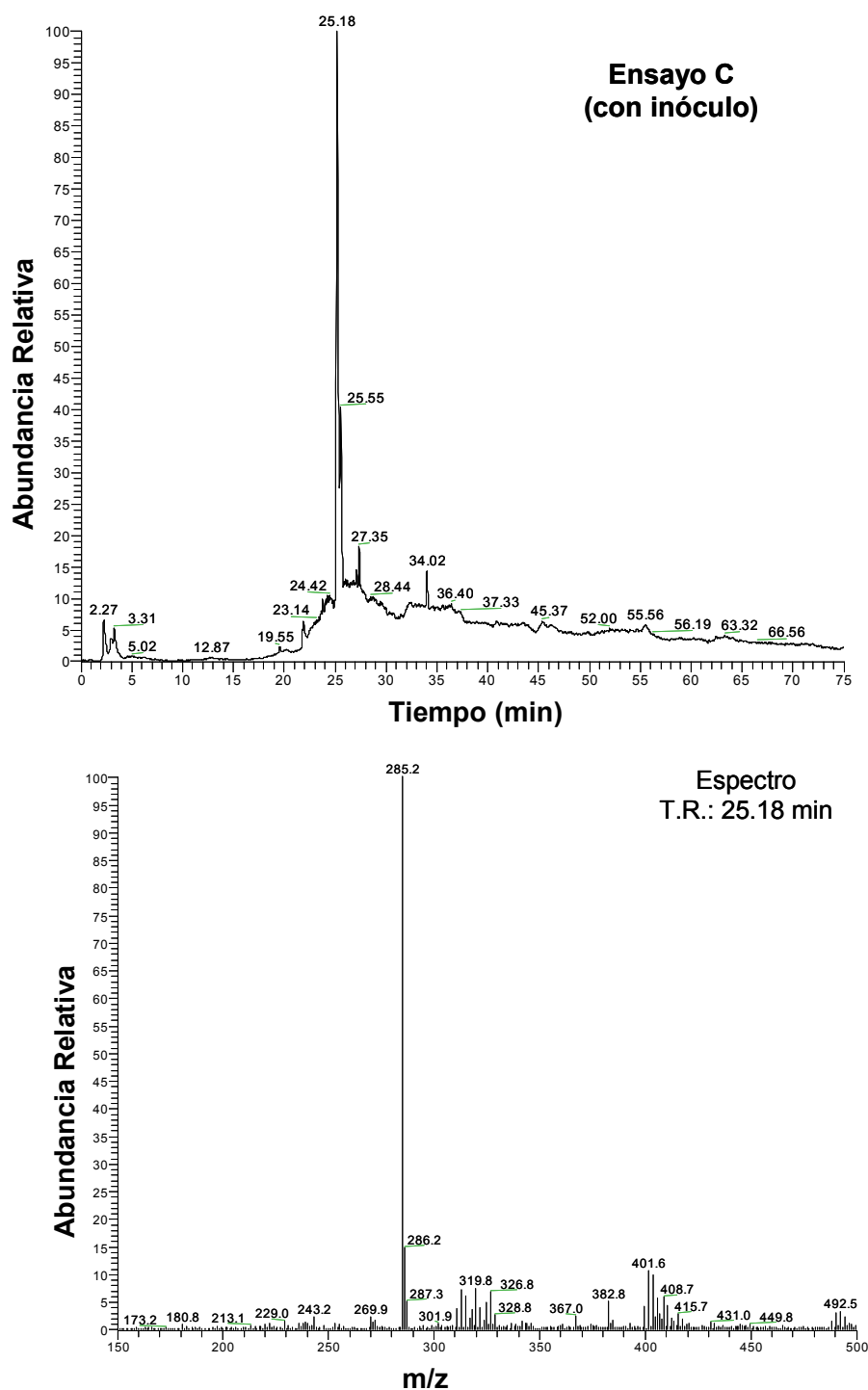


Figura 3.11. Cromatograma obtenido por HPLC/MS de una muestra de la etapa final de un experimento de degradación realizado con C<sub>12</sub>LAS y con inóculo (ensayo C). Se muestra también un espectro correspondiente al principal pico detectado en este caso.

En la mayoría de los experimentos realizados los primeros SPC que se han detectado son los de menor peso molecular ( $C_4$ SPC y  $C_5$ SPC), que predominan durante las primeras horas del ensayo (12-48h). Estos intermedios de degradación proceden probablemente de los isómeros externos, que se degradan con rapidez hasta la ruptura del anillo aromático, paso limitante del proceso y causa de su ralentización. Posteriormente durante la etapa exponencial de degradación, los intermedios más abundantes son los de longitud de cadena intermedia,  $C_5$ - $C_8$ SPC. En esta fase, se detectan también los intermedios de degradación de mayor peso molecular ( $C > 8$ ), normalmente hasta de 2 átomos de carbono menos que la molécula original. En la fase final de la degradación predominan los SPC de 5 a 7 átomos de carbono, que constituyen los “intermedios clave” de este proceso, probablemente derivados de los isómeros más internos y por tanto, los de más difícil oxidación. Estos resultados corroboran los obtenidos previamente por otros autores, que también han concluido que los homólogos de SPC de cadena intermedia ( $C_5$ - $C_8$ ) persisten más que resto en las etapas finales de la degradación del LAS (Field *et al.*, 1992a). Como ejemplo de la secuencia de aparición de los ácidos sulfofenilcarboxílicos se muestran dos series de cromatogramas (Figuras 3.12A y 3.12B), que coinciden a grandes rasgos con la detectada por Di Corcia *et al.*, (1999) en agua dulce. La figura 3.9A corresponde a un experimento de la serie C realizado con inóculo, en la que se han detectado ácidos sulfofenilcarboxílicos de cadena par e impar a partir de la mezcla de isómeros de  $C_{12}$ LAS. La secuencia mostrada en la figura 3.9B corresponde al ensayo F, realizado con el  $2\phi C_{12}$ LAS, en la que los SPC detectados son de cadena par.

La evolución de la concentración de los SPC generados a partir de  $C_{11}$ LAS y el  $C_{12}$ LAS, tanto para aquellos en los que predomina un determinado isómero (ensayo F), como para los homólogos constituidos por mezclas de isómeros (ensayo D) se muestra en la figura 3.13. En todos los casos la concentración máxima detectada corresponde a los SPC de longitud de cadena intermedia, especialmente el  $C_6$ SPC para el  $C_{12}$ LAS y  $C_5$ SPC para  $C_{11}$ LAS. El resto de intermedios de degradación se ha detectado a menor concentración, disminuyendo ésta conforme aumenta la diferencia estructural respecto al homólogo más abundante.

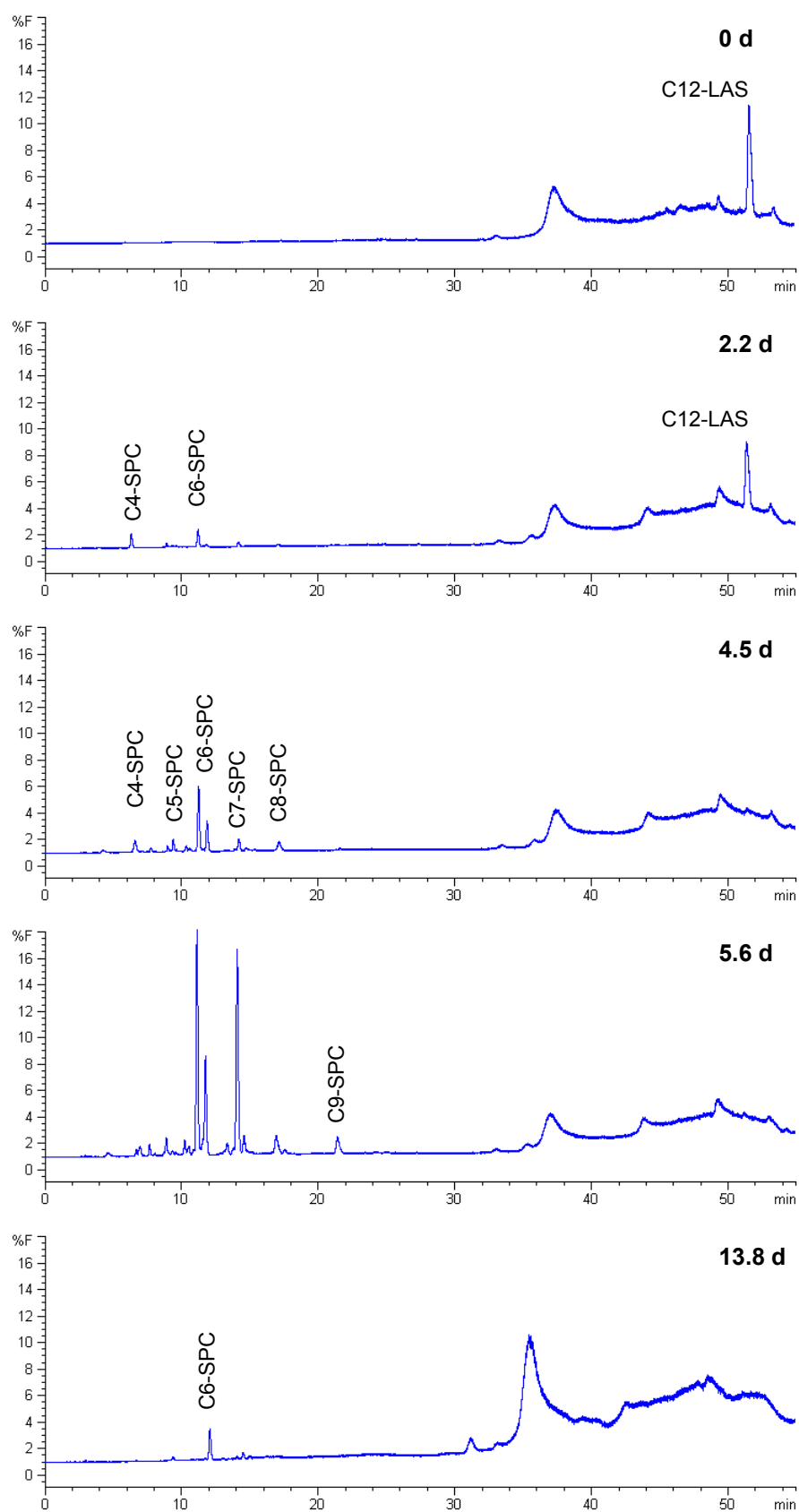
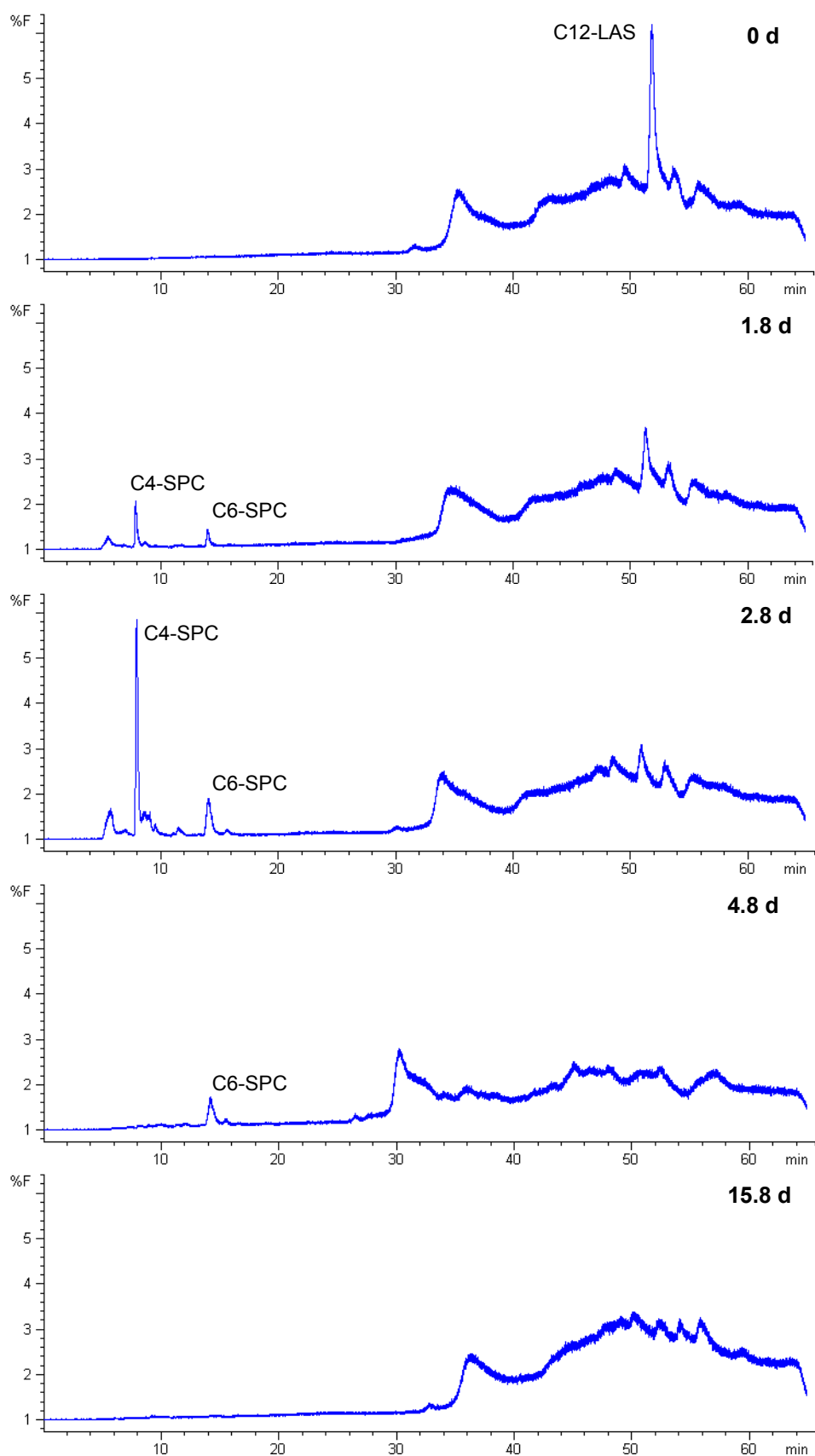
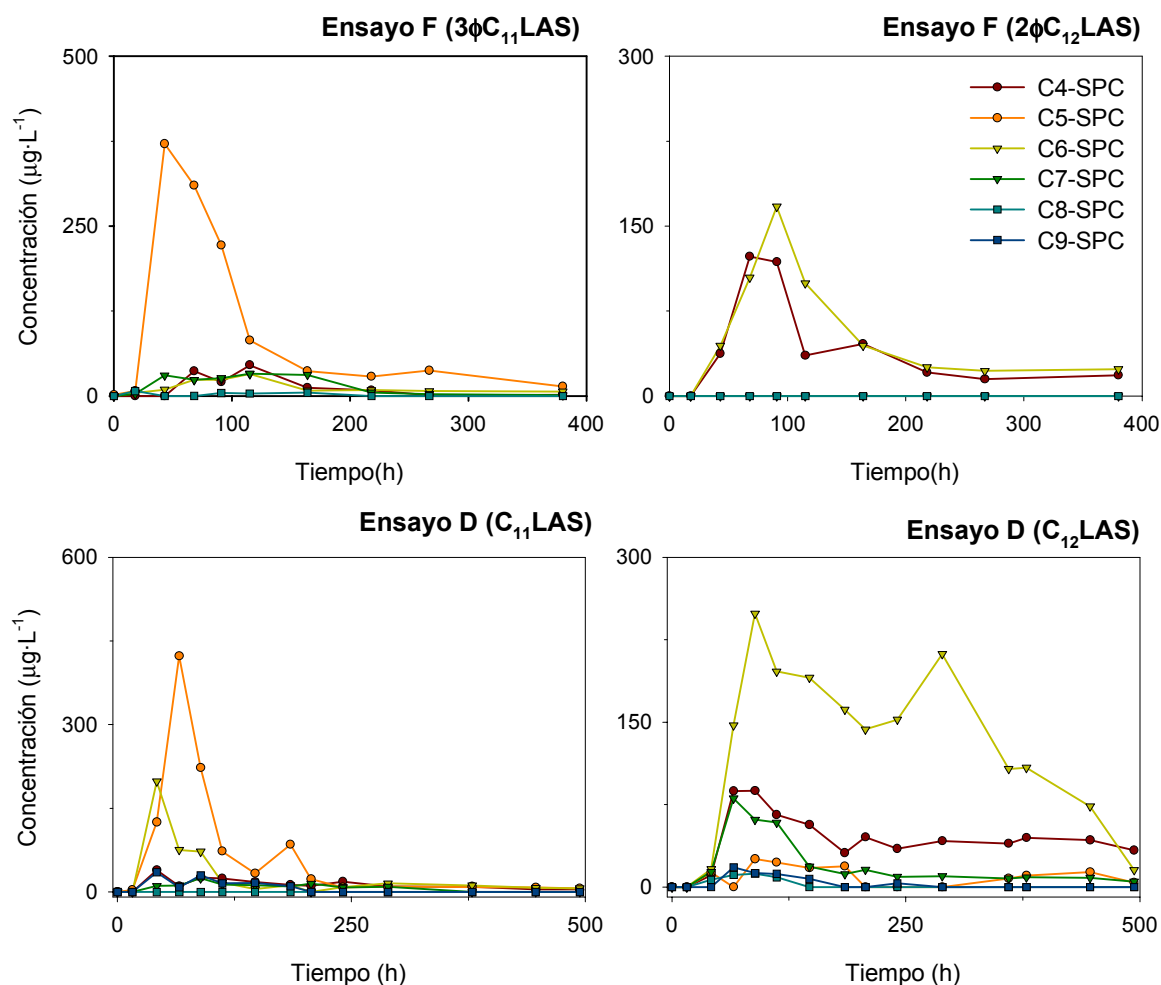


Figura 3.12A. Secuencia de cromatogramas mostrando la secuencia típica de detección de los SPC a partir del C<sub>12</sub>LAS a lo largo del ensayo C (con inóculo).





**Figura 3.12B.** Secuencia de cromatogramas mostrando la aparición de los SPC a partir del  $2\phi C_{12}LAS$  a lo largo del ensayo F.



**Figura 3.13.** Formación de los ácidos sulfofenilcarboxílicos a partir del  $\text{C}_{11}\text{LAS}$  y del  $\text{C}_{12}\text{LAS}$ , partiendo de mezclas y de isómeros puros.

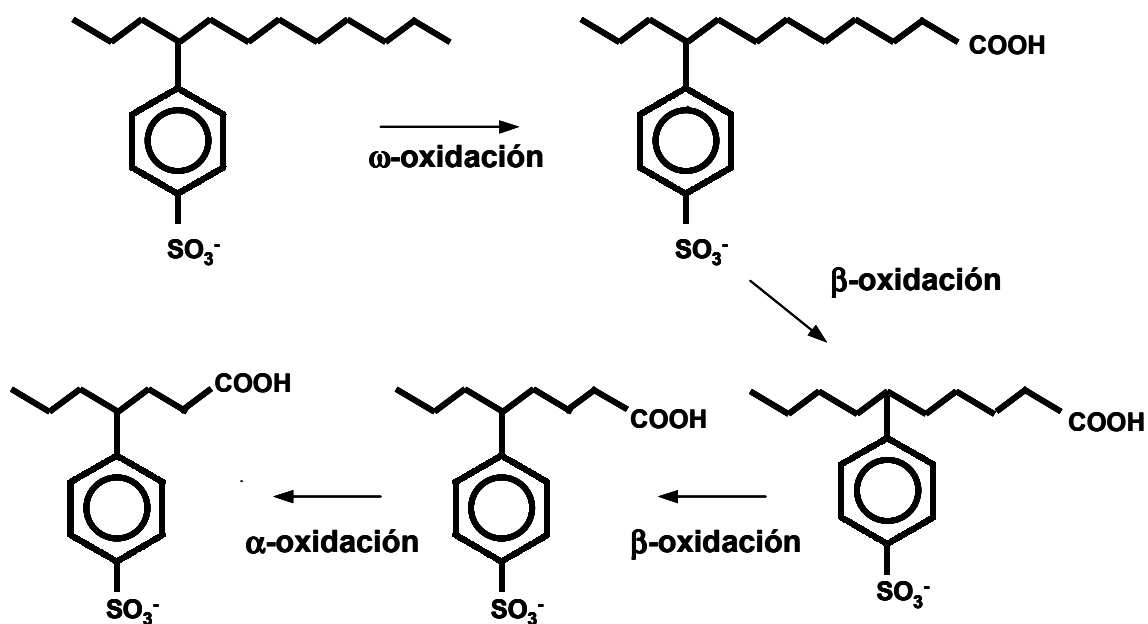
Cuando se han utilizado los homólogos de LAS con un alto porcentaje de un determinado isómero,  $3\phi\text{C}_{11}\text{LAS}$  y  $2\phi\text{C}_{12}\text{LAS}$  (serie de ensayos F), se han detectado únicamente los intermedios de degradación generados por  $\beta$ -oxidación. En estos ensayos los isómeros utilizados son externos, por lo que la oxidación se efectúa sobre uno sólo de los extremos de la cadena. En estas condiciones la  $\beta$ -oxidación tiene mayor relevancia y puede desarrollarse más veces sobre la cadena carboxílica (Fig. 3.14a). Sin embargo en el resto de experimentos (B, C, D, E) se han detectado concentraciones significativas de intermedios de degradación que no se pueden generar por  $\beta$ -oxidación a partir del homólogo de LAS inicial, y que por tanto, se han debido formar por  $\alpha$ -oxidación. La  $\alpha$ -oxidación puede darse para los isómeros internos en los que se dificulta

la  $\beta$ -oxidación por la cercanía del enlace fenílico (Fig. 3.14b), lo que explicaría la detección de intermedios de cadena carboxílica par a partir de un LAS de cadena impar y viceversa.

En función de las concentraciones detectadas de los intermedios de degradación se ha constatado que la  $\beta$ -oxidación es la responsable de, al menos, el 90% del total de las oxidaciones, mientras que la  $\alpha$ -oxidación es un proceso minoritario. Este resultado coincide con lo expuesto previamente por otros autores (Swisher, 1963, 1964; Cain *et al.*, 1972; Schöberl, 1989), aunque difiere aparentemente con trabajos recientes que no consideran esta vía como parte del proceso de degradación (Schulz *et al.*, 2000; Schlenek *et al.*, 2000; Knepper y Kruse, 2000; Cook y Hrsak, 2000). Varios de estos trabajos se han realizado partiendo de cepas puras y por tanto, aportan una visión sesgada de la ruta de degradación, ya que en el medio natural las vías posibles de degradación aumentan al hacerlo también la diversidad microbiológica del sistema. La utilización en nuestro caso de cepas naturales dificulta la dilucidación de rutas específicas del proceso, pero nos permite una adecuada caracterización de lo que acontece en el medio natural.

La presencia de ácidos sulfofenildicarboxílicos (SPDC) no se ha constatado en las muestras analizadas con HPLC/MS, probablemente porque se encuentren a concentraciones muy bajas. Estos intermedios se deben generar a partir de los isómeros internos, concretamente el 5 $\phi$  y 6 $\phi$  en el caso del C<sub>12</sub>LAS, y 4-6 $\phi$  para el C<sub>11</sub>LAS, que presentan dos ramas de la cadena alquílica suficientemente largas para que la oxidación se pueda producir sobre ambos extremos. Estos isómeros son los menos abundantes en el LAS comercial y también en los homólogos utilizados en los ensayos de biodegradación, por tanto, los intermedios dicarboxilados que puedan haberse generado deben constituir una fracción minoritaria en el conjunto de intermedios de degradación. Estos intermedios de degradación, concretamente el C<sub>5</sub>SPDC y el C<sub>6</sub>SPDC, han sido detectados por Di Corcia *et al.*, (1999a) en ensayos realizados de laboratorio, partiendo de concentraciones iniciales de LAS de hasta 8  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , especialmente en la etapa final del proceso de degradación.

### ISÓMERO INTERNO DEL LAS



### ISÓMERO EXTERNO DEL LAS

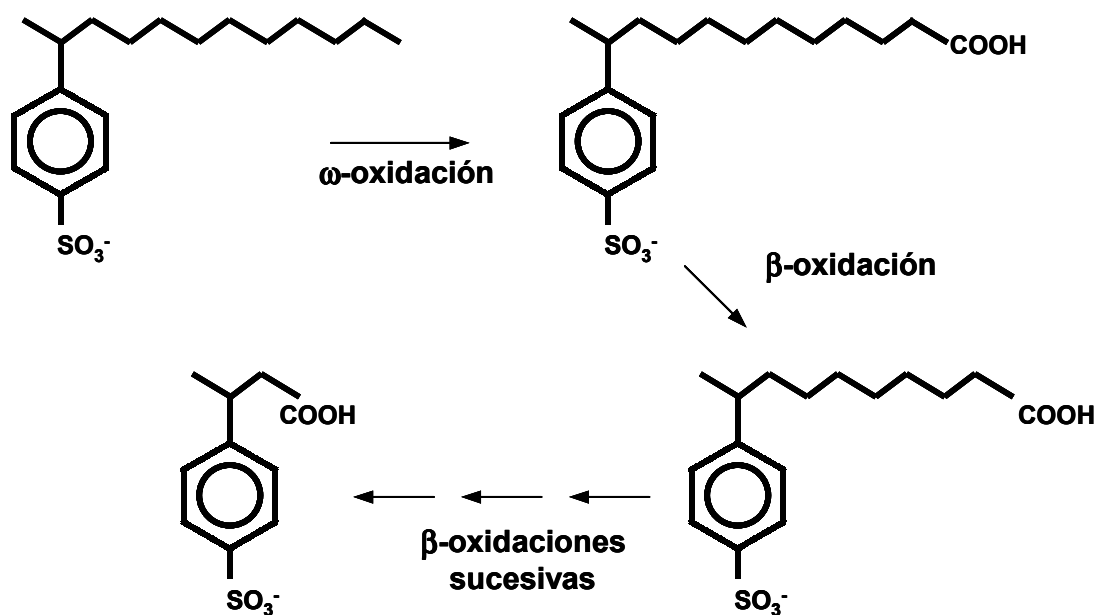
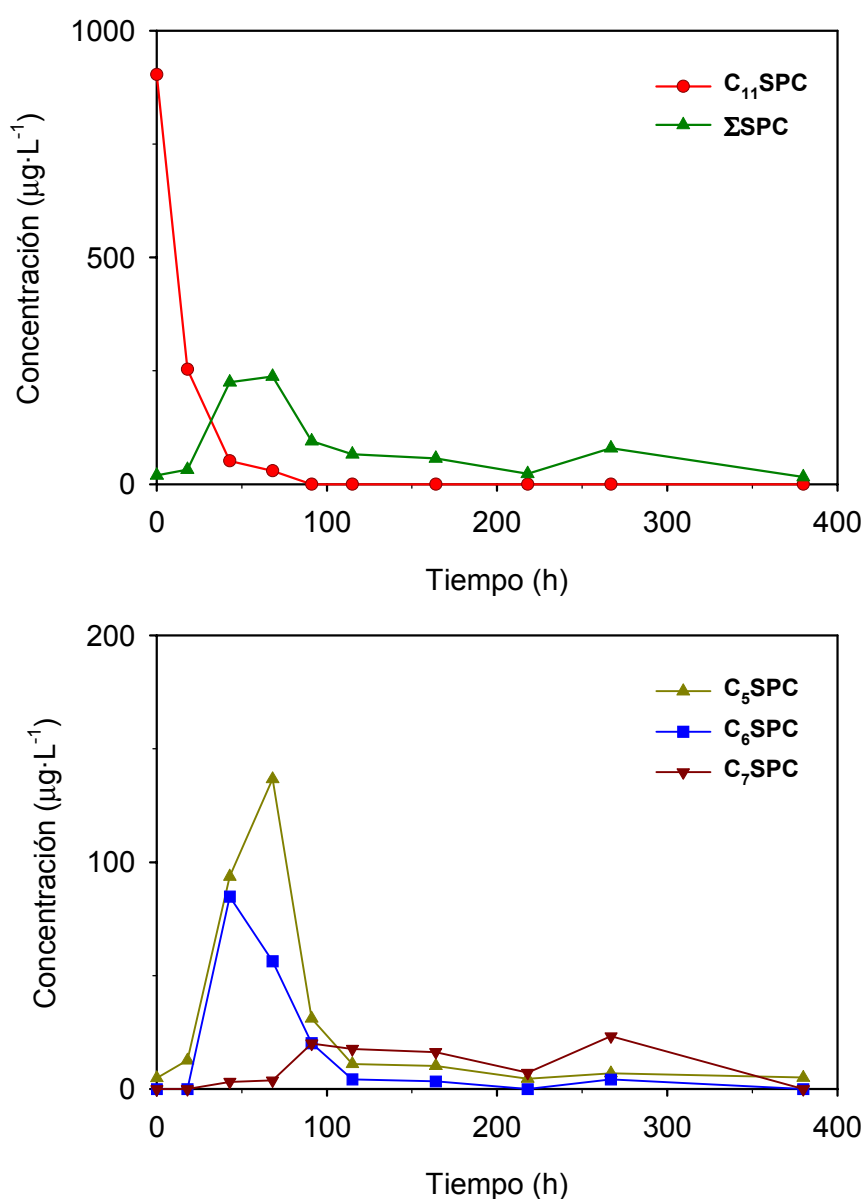
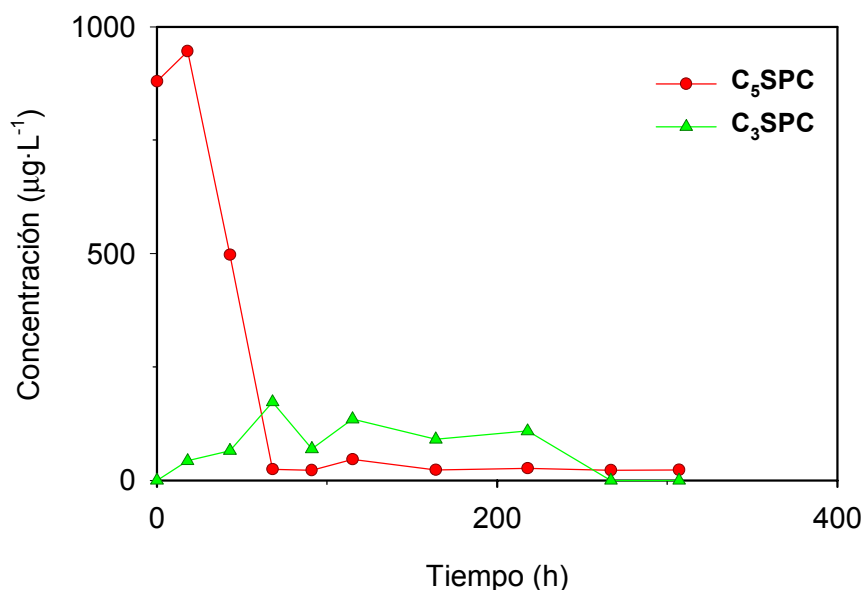


Figura 3.14. Rutas probables del acortamiento de la cadena alquílica durante la degradación del LAS, para un isómeros interno, 4 $\phi$ C<sub>12</sub>LAS (a) y un isómero interno, el 2 $\phi$ C<sub>12</sub>LAS.

La  $\beta$ -oxidación es la ruta predominante, también en la degradación de los SPC, como se muestra para el  $C_{11}$ SPC en la figura 3.15 y para el  $5\phi C_5$ SPC en la figura 3.16. La mayores concentraciones de sus intermedios de degradación del  $C_{11}$ SPC y el  $5\phi C_5$ SPC han correspondido al  $C_5$ SPC y al  $C_3$ SPC (concentraciones estimativas) respectivamente. Sin embargo, a partir del  $C_{11}$ SPC, se han detectado concentraciones significativas del  $C_6$ SPC, que ha debido ser generado por  $\alpha$ -oxidación. Estos resultados confirman las conclusiones expuestas hasta ahora sobre la degradación del LAS.



**Figura 3.15.** Variación de la concentración del  $C_{11}$ SPC y la concentración total de SPC generados ( $\Sigma$ SPC) a partir de él (figura superior), y de los principales intermedios de degradación (figura inferior) en el ensayo F.



**Figura 3.16.** Variación de la concentración del 5φC<sub>5</sub>SPC y del C<sub>3</sub>SPC (concentración estimada), generado como único intermedio de degradación en el ensayo F. Los valores de concentración del C<sub>3</sub>SPC son aproximados (método no es idóneo para este homólogo).

De forma teórica, la degradación del LAS se puede describir como una serie de oxidaciones consecutivas: en primer lugar se generan a partir del LAS, los SPC de cadena carboxílica más larga (C<sub>9</sub>-C<sub>14</sub>), seguidamente nuevas oxidaciones generan los intermedios de longitud de cadena intermedia (C<sub>6</sub>-C<sub>8</sub>), a continuación los SPC de menor peso molecular (<C<sub>6</sub>), que son finalmente degradados mediante la ruptura del anillo aromático. Una vez producida la ω-oxidación, las primeras oxidaciones de la cadena carboxílica son muy rápidas, y por ello, no se han detectado concentraciones significativas de los primeros intermedios de degradación. Los ácidos sulfofenilcarboxílicos de 9 a 10 átomos de carbono se han detectado en muchos ensayos pero no se han podido cuantificar en todos los casos, por encontrarse a niveles próximos al límite de detección. La no detección de concentraciones significativas de estos intermedios y, el no haber observado un desplazamiento temporal en la formación de los sucesivos SPC -primero los SPC de mayor peso molecular, a continuación los SPC de longitud de cadena intermedia y por último los más polares- ha imposibilitado una caracterización cinética de cada una de las etapas del proceso de degradación en estas condiciones. El uso de bajas concentraciones de LAS, con objeto de que los ensayos

sean representativos desde el punto de vista ambiental, ha limitado los parámetros cinéticos que se han podido determinar. Por ello, el análisis de la cinética de formación y degradación de los ácidos sulfofenilcarboxílicos se ha realizado sobre la concentración total de SPC. Un ensayo con concentraciones más altas de LAS, quizás hubiera permitido detectar mayores concentraciones de los primeros intermedios de degradación y establecer las constantes de su formación y degradación, a expensas de una pérdida en relevancia ambiental de los resultados.

### 3.3.3. Formación de los ácidos sulfofenilcarboxílicos a partir del LAS

#### A. Ajuste cinético de la formación-degradación de los ácidos sulfofenilcarboxílicos

Para desarrollar una ecuación capaz de explicar a la evolución de la concentración total de los ácidos sulfofenilcarboxílicos ( $\Sigma$ SPC) se ha optado por desarrollar un modelo a partir del desarrollado por Quiroga et al., (1999) para el LAS, considerando que su biodegradación es completa ( $q=0$ ), como han confirmado los resultados experimentales expuestos previamente. En este caso el modelo se reduce a la siguiente expresión:

$$[LAS] = \frac{h}{1 + \left( \frac{h}{C_0} - 1 \right) \cdot e^{\mu_{max} \cdot \frac{h}{S_0} \cdot t}} \quad \text{o la equivalente} \quad [LAS] = \frac{a}{1 + b \cdot e^{c \cdot (b+1) \cdot t}} \quad (3)$$

donde:  $a = h$ ,  $b = h/C_0 - 1$  y  $c = \mu_{max}$ , siendo  $C_0$  la concentración inicial de sustrato,  $\mu_{max}$  la tasa de crecimiento específica de los microorganismos y  $h$  es, de nuevo, la concentración máxima de materia orgánica disponible en el medio.

La concentración total de ácidos sulfofenilcarboxílicos presentes en el medio en un determinado instante es resultado de su formación a partir de la biodegradación primaria del LAS, y de su propia degradación. Este modelo se ha desarrollado como aplicación de la ecuación (3), considerando que la materia orgánica disponible ( $h$ ) para la degradación no es constante, sino que es función del tiempo, y corresponde al LAS que se ha degradado en cada tiempo  $t$ . El proceso de degradación del LAS de forma simplificada se podría representar como:

LAS  $\Rightarrow$  SPC  $\Rightarrow$  Otros productos

Así la concentración total de los ácidos sulfofenilcarboxílicos viene dada por:

$$[SPC] = [SPC]_{\text{formación}} - [SPC]_{\text{desaparición}} \quad \text{donde}$$

$$[SPC]_{\text{formación}} = k \cdot \left( \frac{a_{LAS}}{1 + b_{LAS}} - \frac{a_{LAS}}{1 + b_{LAS} \cdot e^{m \cdot c_{LAS} \cdot (b_{LAS} + 1) \cdot t}} \right)$$

$$[SPC]_{\text{desaparición}} = \frac{k \cdot \left( \frac{a_{LAS}}{1 + b_{LAS}} - \frac{a_{LAS}}{1 + b_{LAS} \cdot e^{m \cdot c_{LAS} \cdot (b_{LAS} + 1) \cdot t}} \right)}{1 + b \cdot e^{c \cdot (b + 1) \cdot t}}$$

y por tanto, la expresión final para la concentración de SPC en el medio es la siguiente:

$$[SPC] = X - \frac{n \cdot X}{1 + b \cdot e^{c \cdot (b + 1) \cdot t}} \quad (4) \quad \text{siendo } X = k \cdot \left( \frac{a_{LAS}}{1 + b_{LAS}} - \frac{a_{LAS}}{1 + b_{LAS} \cdot e^{m \cdot c_{LAS} \cdot (b_{LAS} + 1) \cdot t}} \right)$$

En esta expresión  $X$  representa la concentración total de ácidos sulfofenilcarboxílicos generados a partir de la degradación del LAS en cada instante, y  $b$ ,  $c$ ,  $k$ ,  $n$  y  $m$  son parámetros de ajuste. Por analogía con el modelo utilizado para la degradación primaria, los parámetros  $b$  y  $c$  deben representar lo mismo que sus equivalentes en el modelo original, es decir, la relación de microorganismos presentes por unidad de sustrato ( $h/C_0$ ), y la tasa específica de crecimiento de los microorganismos responsables de la degradación de los SPC (velocidad de degradación), respectivamente. Esta expresión es empírica, y el resto de parámetros se han introducido para que conseguir modelizar satisfactoriamente la variación de la concentración de SPC con el tiempo. Los parámetros  $k$ ,  $m$  y  $n$  están estrechamente interrelacionados, y pueden explicar variaciones similares en el ajuste. Por tanto, estos parámetros deben ser dependientes entre sí, pero para determinar su relación sería necesario un trabajo microbiológico más preciso y específico. De modo que no es posible obtener conclusiones directas sobre los valores obtenidos para  $k$ ,  $n$  y  $m$ , hasta que no se determine lo que representan. A pesar de estas deficiencias, el modelo propuesto es una herramienta de gran interés, ya que nos va a permitir estimar la velocidad de degradación de los ácidos sulfofenilcarboxílicos, considerando su cinética de formación a partir del LAS.



En estos ajustes la concentración total de los ácidos sulfofenilcarboxílicos se expresa en  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  y el tiempo en horas. Al igual que en los ajustes aplicados para el LAS, se han realizado un máximo de 300 iteraciones y se ha tomado  $10^{-4}$  como criterio de convergencia. Los parámetros iniciales utilizados han sido  $b=0.01$ ,  $c=0.01$ ,  $n=1$ ,  $m=0.1$ , y para  $k$  ha variado entre 0.3 y 0.8 dependiendo del caso. Todos los ajustes se han realizado utilizando las aplicaciones estadísticas del programa gráfico *Sigma-Plot 4.0*. En general, los ajustes obtenidos con este modelo son muy satisfactorios con buenos coeficientes de correlación ( $r^2>0.9$  en la mayoría de los casos) como se mostrará a continuación en las distintas aplicaciones realizadas.

### **B. Efecto de la adición de inóculo**

Los resultados de los ajustes obtenidos para la modificación del modelo de orden variable se muestran en la tabla 3.16, y como ejemplo se han representado en la figura 3.17 dos casos del ensayo C, uno con inóculo y otro sin inóculo. Los buenos ajustes obtenidos corroboran la validez del modelo para explicar la evolución de la degradación de los SPC. Los ácidos sulfofenil monocarboxílicos generados a partir del  $\text{C}_{12}\text{LAS}$  se degradan también con más rapidez en los ensayos que contienen el inóculo (Fig. 3.17). La inoculación asegura la presencia en el sistema de una comunidad de microorganismos adaptados a la degradación del LAS y de sus intermedios de degradación, lo que les permite desarrollar el proceso completo en menos tiempo. Esta tendencia se ha apreciado en todos y cada uno de los ensayos realizados.

La concentración de SPC alcanza el máximo después de que se haya degradado al menos la mitad del LAS. En los ensayos con inóculo, que son los que transcurren con mayor rapidez, se ha llegado a detectar una concentración total de SPC que representa entre el 70-80% del LAS inicial. En cambio en el resto de ensayos la máxima concentración detectada constituye menos del 50% del LAS inicial, con una mayor persistencia de los SPC en el medio.

La proporción de microorganismos totales presentes por unidad de sustrato ha sido similar en todos los casos, como se puede apreciar por la similitud de los valores obtenidos para el cociente  $h/\text{C}_0$  ( $b+1$ ). Sin embargo, la velocidad de degradación de los SPC es mayor en los ensayos en los que se adicionó inóculo. Este aumento en la velocidad del proceso de degradación en la serie de ensayos C es del 200%, por lo que se constata la mayor capacidad de degradación de los SPC de la flora bacteriana con un

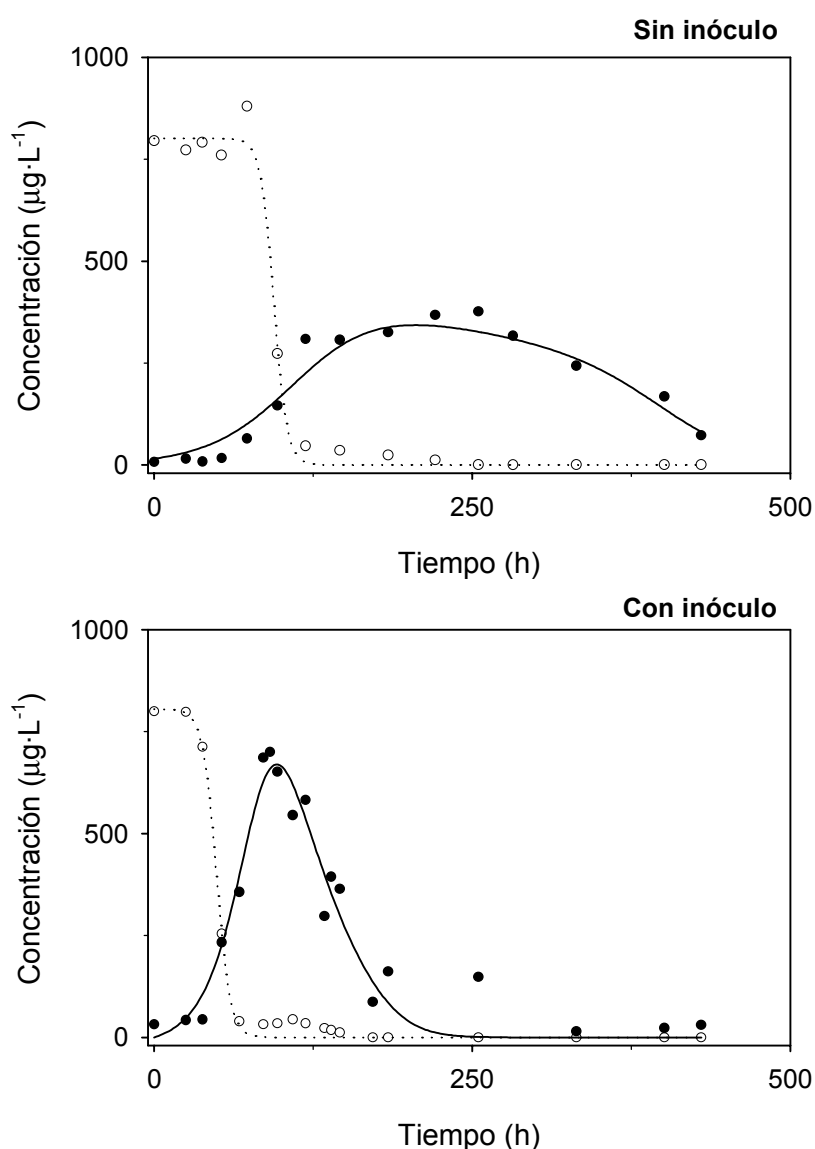


Figura 3.17. Variación de la concentración total de los ácidos sulfofenicarboxílicos en dos casos de la serie C, un ensayo realizado sin inóculo y otro ensayo con inóculo, mostrando en línea discontinua el ajuste correspondiente al LAS y en línea continua el obtenido para el SPC con la modificación del modelo cinético propuesta para estos intermedios de degradación.

Tabla 3.16. Ajuste de la concentración total de SPC, generados a partir del C12LAS en el ensayo C en presencia de inóculo o sin él, obtenido aplicando el modelo empírico basado en el modelo de orden variable utilizado para el LAS.

Inoculación	m	n	K	$h/C_0(b+1)$	$\mu_{\max}(c)$	$r^2$
No	0.1559	-119.7436	0.4000	1.0193	0.0219	0.962
No	0.1478	-2523.26	0.7995	1.0306	0.0293	0.906
Si	0.3351	-353.26	0.1969	1.0084	0.0495	0.926
Si	0.2649	-1576.05	0.1618	1.0026	0.0699	0.941

amplio periodo de exposición a contaminación de origen urbano. El efecto de la adición de inóculo en la cinética de degradación de los SPC es mayor que para la biodegradación primaria del LAS.

### C. Efecto de la temperatura

Los SPC han sido extensamente degradados tanto a 10°C como a 25°C (Tabla 3.17), lo que corrobora que esta variable no afecta a la extensión de la degradación del LAS, sino a la cinética del proceso. De hecho se ha observado que la degradación de los ácidos sulfofenilcarboxílicos es más lenta a 10°C que a 25°C (Figuras 3.18 y 3.19). Concretamente la biodegradación del C<sub>11</sub>LAS y sus intermedios de degradación se ha completado en 40 días en los ensayos realizados a 10°C, y en un periodo superior para el caso del C<sub>12</sub>LAS. En cambio, cuando se realizó el ensayo a 25°C la degradación de todos los compuestos determinados (LAS y SPC) superó el 99% después de 21 días.

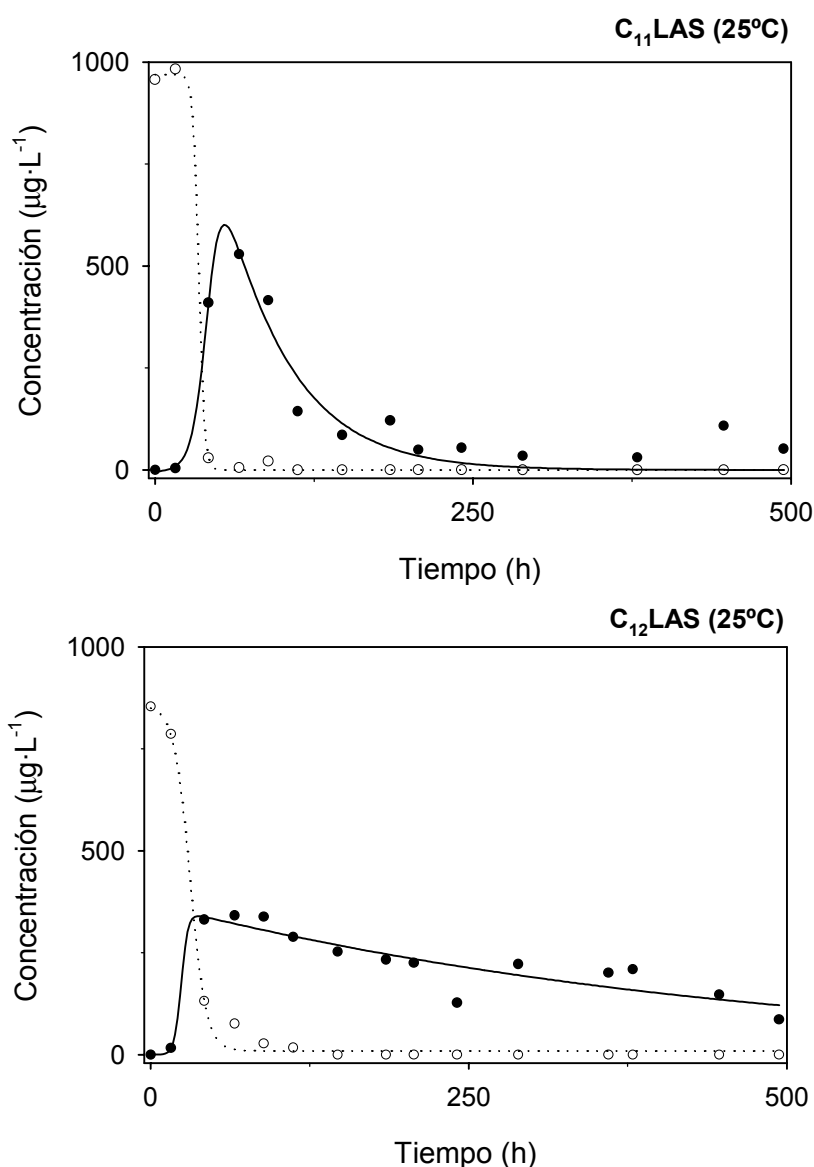
En los ensayos desarrollados a 10°C, la concentración máxima del total de los SPC que supone entre un 30 y un 50% del LAS inicial, y este porcentaje suele alcanzar hasta un 70% en los ensayos inoculados desarrollados a 25°C. En general, se puede concluir que la concentración máxima de  $\Sigma$ SPC detectada es menor cuando la cinética de degradación es más lenta, como ocurre en los ensayos realizados a baja temperatura, o tal y como se ha comentado previamente, en los ensayos realizados sin adición de inóculo.

**Tabla 3.17. Ajuste de la concentración total de SPC aplicando el modelo empírico basado en el modelo de orden variable utilizado para el LAS.**

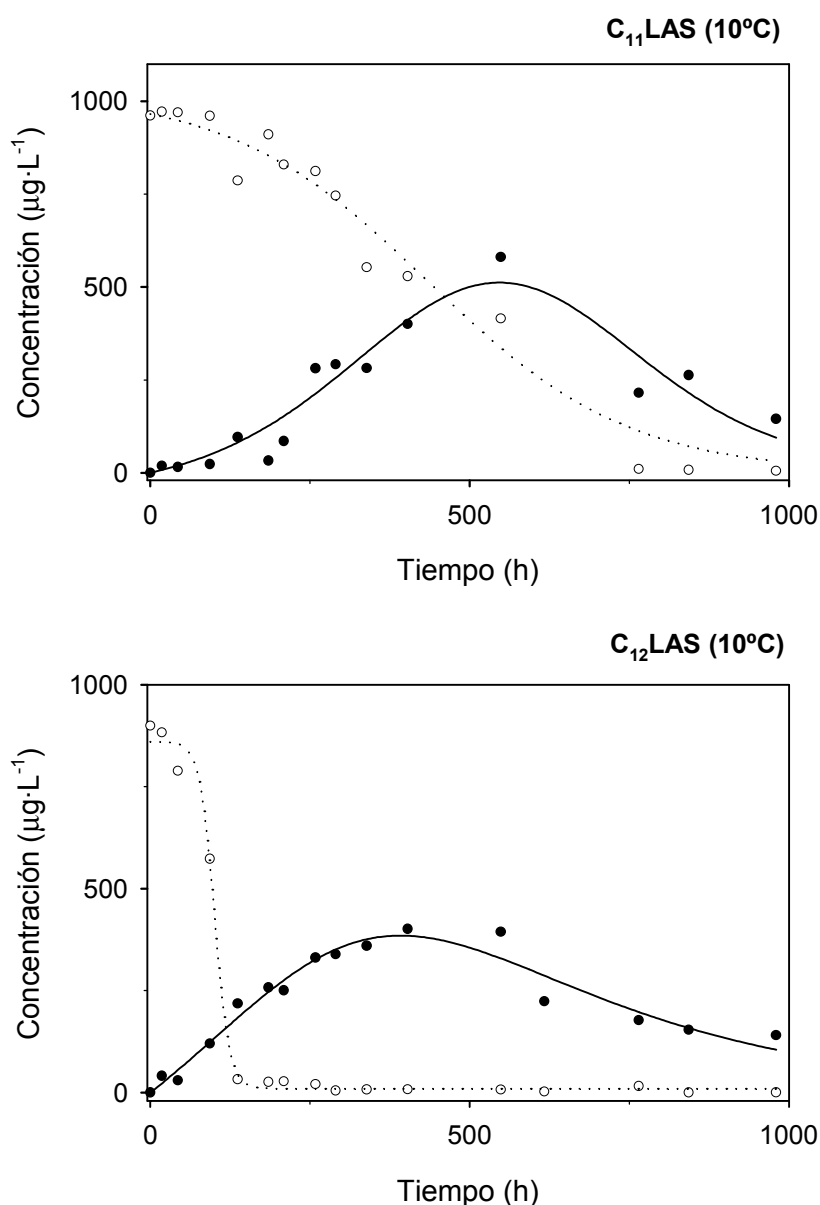
Ensayo	Homólogo	T(°C)	m	n	k	$h/C_0(b+1)$	$\mu_{\max}(c)$	$r^2$
D	3 $\phi$ C <sub>11</sub> LAS	25	0.1676	-6725.97	0.3642	1.0067	0.0993	0.900
D	C <sub>12</sub> LAS II	25	0.0688	-39049.99	2.4186	10.9424	0.0018	0.717
D	C <sub>12</sub> LAS II	25	0.0393	-30.5067	4.6886	3.8687	0.0023	0.628
E	3 $\phi$ C <sub>11</sub> LAS	10	0.0816	-2.621	0.2735	1.0061	0.0074	0.914
E	3 $\phi$ C <sub>11</sub> LAS	10	0.1090	-6858	0.1048	1.0005	0.0126	0.986
E	C <sub>12</sub> LAS II	10	0.0445	-3007	0.7231	1.1534	0.0061	0.959
E	C <sub>12</sub> LAS II	10	0.0882	-135.5	0.4412	2.6640	0.0005	0.849

En los ensayos D y E la degradación de los SPC es más lenta que en

experimentos anteriores, probablemente por la menor capacidad de degradación de la población bacteriana presente en el medio. De hecho, el número inicial de bacterias presentes en estos ensayos es inferior a la del resto (Tabla 3.21). Esta reducida flora inicial en los ensayos puede ser, en parte, responsable de la más lenta degradación de los SPC en estos casos.



**Figura 3.18.** Variación de la concentración total de los ácidos sulfofenilcarboxílicos en dos casos de la serie D: un ensayo realizado con C<sub>11</sub>LAS (a) y otro con el C<sub>12</sub>LAS (b), mostrando en línea discontinua el ajuste correspondiente al LAS y en línea continua el obtenido para el SPC con la modificación del modelo cinético propuesta para estos intermedios de degradación.



**Figura 3.19. Variación de la concentración total de los ácidos sulfofenicarboxílicos en dos casos de la serie E: un ensayo realizado con C<sub>11</sub>LAS (E11<sub>1</sub>) (a) y otro con el C<sub>12</sub>LAS(E12<sub>1</sub>) (b), mostrando en línea discontinua el ajuste correspondiente al LAS y en línea continua el obtenido para el SPC con la modificación del modelo cinético propuesta para estos intermedios de degradación.**

Los resultados obtenidos en esta memoria corroboran que la biodegradación del LAS debe presentar una clara componente estacional en los sistemas litorales, como otros autores han expuesto previamente (Terzic *et al.*, 1992a; Sales *et al.*, 1987). Así, en las zonas costeras el porcentaje de LAS degradado de la columna de agua debe ser alto durante el verano, debido a que la rápida cinética de degradación del LAS y sus intermedios de degradación, y sin embargo, este porcentaje debe estar fuertemente reducido en invierno.

#### **D. Influencia de la estructura molecular: longitud de la cadena alquílica, composición isomérica y presencia de un grupo carboxílico terminal**

En la tabla 3.18 se muestran los valores medios de los parámetros cinéticos de primer orden obtenidos en el ensayo de degradación F, para el C<sub>11</sub>LAS y dos de sus probables intermedios de degradación, el C<sub>11</sub>SPC y el 5 $\phi$ C<sub>5</sub>SPC. La fase de latencia es ligeramente superior para el C<sub>11</sub>LAS que para los ácidos sulfofenilcarboxílicos. Una vez iniciada la degradación, la constante cinética de primer orden (k) es menor para el C<sub>11</sub>LAS (0.37 d<sup>-1</sup>) que para los C<sub>11</sub>SPC (0.97d<sup>-1</sup>), mostrando que la  $\beta$ -oxidación se produce con mayor rapidez que la  $\omega$ -oxidación. En este sentido la diferencia existente entre el tiempo de vida media del C<sub>11</sub>LAS y el C<sub>11</sub>SPC, indica que la  $\omega$ -oxidación debe ser uno de los pasos limitantes en la degradación, tal y como expusieron previamente Hrsak y Grbic-Galic (1995).

**Tabla 3.18. Valores medios de las constantes cinéticas primer orden (A, k), la fase de latencia y tiempo de vida media (t<sub>1/2</sub>) para los ensayos F11, FS11 y FS5, realizados con C<sub>11</sub>LAS, C<sub>11</sub>SPC y 5 $\phi$ C<sub>5</sub>SPC respectivamente.**

Homólogo	F. latencia (h)	A (%)	K(d <sup>-1</sup> )	t <sub>1/2</sub> (d)	t <sub>1/2 real</sub> (d)
3 $\phi$ C <sub>11</sub> LAS	18	104.5	0.37	1.89	2.64
C <sub>11</sub> SPC	0 (*)	100.9 $\pm$ 1.9	0.96 $\pm$ 0.35	0.77 $\pm$ 0.28	0.71
5 $\phi$ C <sub>5</sub> SPC	9.0 $\pm$ 12.7	99.3 $\pm$ 0.2	0.97 $\pm$ 0.10	0.72 $\pm$ 0.08	1.12

(\*)La fase de latencia no se ha detectado con la secuencia de muestreo utilizada.

La degradación del ácido sulfofenilpentanoico (5 $\phi$ C<sub>5</sub>SPC) ha requerido una etapa de aclimatación que no se ha detectado para su homólogo el C<sub>11</sub>SPC. La degradación de los SPC de cadena intermedia y corta se desarrolla mediante la oxidación de la cadena carboxílica, sujeta a un mayor impedimento estérico que para los homólogos de mayor peso molecular. Estas últimas oxidaciones constituyen, junto con la ruptura del anillo aromático, las etapas limitantes en la degradación para este tipo de moléculas, y por ello, estos SPC son considerados los *intermedios clave* en la degradación del LAS.

La biodegradación del 3 $\phi$ C<sub>11</sub>LAS y del 2 $\phi$ C<sub>12</sub>LAS en la serie de ensayos F se completa entre 100 y 150 horas después del inicio del experimento, y sin embargo, la degradación completa de sus intermedios requiere unas 500 horas cuando se ha realizado a 25°C y más del doble a 10°C. Esto confirma que la degradación de los SPC

es el proceso limitante en la degradación completa del LAS.

La degradación de los homólogos de los ácidos sulfonilcarboxílicos se completa con rapidez en los ensayos realizados con el C<sub>11</sub>SPC y el 5φC<sub>5</sub>SPC, como indican los parámetros obtenidos a partir del modelo de orden variable (Tabla 3.19a). Las constantes cinéticas de la ecuación diferencial de este mismo modelo obtenidas estos se muestran en la tabla 3.19b. Al igual que ocurrió para el caso de los homólogos del LAS, no se puede desestimar ninguno de los sumandos y se trata también de una reacción de cinética compleja.

**Tabla 3.19a. Parámetros cinéticos obtenidos para el C<sub>11</sub>SPC y 5φC<sub>5</sub>LAS en la serie F a partir del modelo de orden variable propuesto por Quiroga *et al.*, (1989).**

Homólogo	C <sub>0</sub> (μg·L <sup>-1</sup> )	h(μg·L <sup>-1</sup> )	q (μg·L <sup>-1</sup> )	p (h <sup>-1</sup> )	r <sup>2</sup>
C <sub>11</sub> SPC	900	903.7	6	0.1923	0.998
C <sub>11</sub> SPC	800	1000	8	0.1371	0.997
5φC <sub>5</sub> SPC	950	950.2	15	0.1917	0.996
5φC <sub>5</sub> SPC	950	953.4	14	0.2983	0.999

**Tabla 3.19b. Constantes cinéticas de la ecuación diferencial de velocidad del modelo de orden variable obtenidas para cada uno de los ensayos realizados.**

Homólogo	Inóculo	T (°C)	K <sub>0</sub>	K <sub>1</sub>	K <sub>2</sub>	r <sup>2</sup>
C <sub>11</sub> SPC	Si	25	43.24	0.1948	-2.14·10 <sup>-4</sup>	0.998
C <sub>11</sub> SPC	Si	25	27.18	0.1400	-1.73·10 <sup>-4</sup>	0.997
5φC <sub>5</sub> SPC	Si	25	44.36	0.2023	-2.07·10 <sup>-4</sup>	0.996
5φC <sub>5</sub> SPC	Si	25	69.40	0.3138	-3.21·10 <sup>-4</sup>	0.999

En general la tasa específica de crecimiento de microorganismos responsables de la degradación es mayor para el LAS (0.05-0.3 d<sup>-1</sup>) que para el conjunto de SPC generados (Tablas 3.16, 3.17 y 3.20) a partir de él (<0.12 d<sup>-1</sup>). Esto se debe a que la degradación del conjunto de los SPC requiere un mayor esfuerzo (acortamiento de la cadena y finalmente la ruptura del anillo aromático) por parte de los microorganismos que la oxidación de la cadena alquílica del LAS.

**Tabla 3.20. Parámetros cinéticos obtenidos para el ajuste de la concentración total de SPC generados a partir de C<sub>11</sub>LAS, C<sub>12</sub>LAS, C<sub>11</sub>SPC y 5φC<sub>5</sub>SPC en la serie de ensayos de degradación F, aplicando la modificación del modelo de orden variable, en distintos ensayos de degradación con como sustrato.**

ENSAYO	m	n	k	h/S <sub>0</sub> (b+1)	μ <sub>max</sub> (c)	r <sup>2</sup>
3φC <sub>11</sub> LAS	0.1871	-10394.80	0.5318	1.0287	0.0793	0.852
2φC <sub>12</sub> LAS	0.1304	-14.88	0.3372	1.0000	0.1209	0.982
2φC <sub>12</sub> LAS	0.9010	-0.4086	0.5635	1.0890	0.0211	0.817
C <sub>11</sub> SPC	0.3360	-50.7152	0.2392	1.0048	0.0973	0.891
C <sub>11</sub> SPC	0.0382	-17.7471	0.5173	1.2481	0.0253	0.787
5φC <sub>5</sub> SPC	0.1862	-8894.46	0.2953	1.4887	0.0301	0.704

Cavalli *et al.*, (1993) indicaron que la mineralización puede ser rápidamente llevada a cabo una vez que desaparecen los SPC, de modo que cuando se degradan los SPC se puede decir que se ha llegado a la biodegradación última. Según esta consideración, podríamos afirmar que la mineralización del LAS en agua de mar supera el 98% en todos los casos (excepto en algunos ensayos que hubieran requerido una duración mayor).

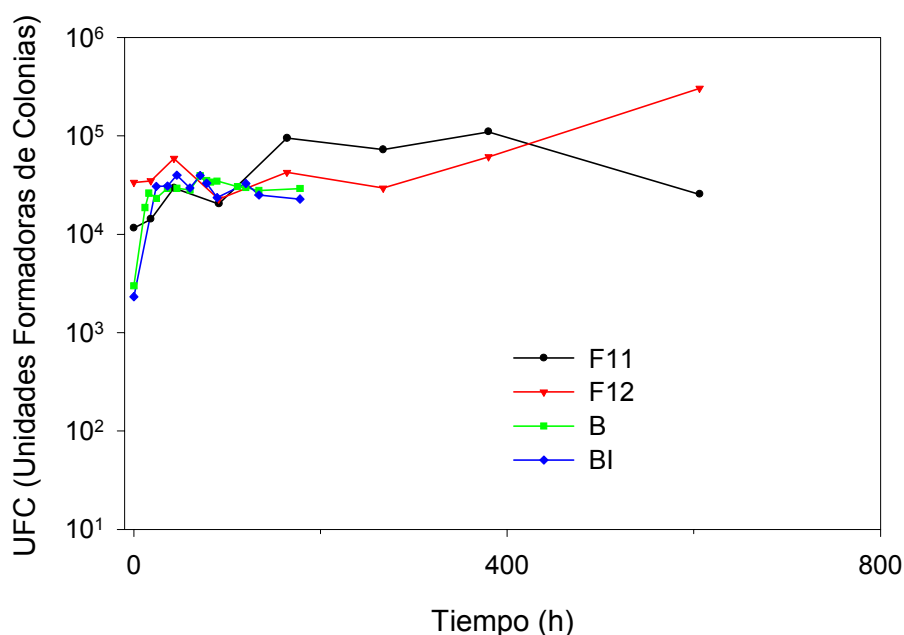
A modo de resumen, se ha observado que la biodegradación primaria del dodecilbenceno sulfonato (C<sub>12</sub>-LAS) y del undecilbenceno sulfonato (C<sub>11</sub>-LAS) ha superado en todos los casos el 99% (según las concentraciones residuales reales, y no las derivadas de los ajustes), sin que se detecten al final de los ensayos concentraciones residuales del compuesto (límite de detección=1μg·L<sup>-1</sup>). Por tanto se ha corroborado la biodegradabilidad del LAS en agua de mar, incluso a bajas temperaturas y sin la adición de inóculo. La biodegradación del LAS han presentado un tiempo de vida medio para los homólogos estudiados entre 0.5 y 8 días, con valores superiores en casos particulares. La gran variabilidad de los resultados obtenidos está en consonancia con los obtenidos previamente por Vives-Rego *et al.*, (2000) para este mismo compuesto, y es consecuencia de la propia variabilidad del sistema, que queda recogida en estos ensayos fundamentalmente por la utilización de agua e inóculos naturales.

Por último se muestran una serie de datos complementarios relacionados con la población microbiana presente en los ensayos de degradación: evolución e identificación.



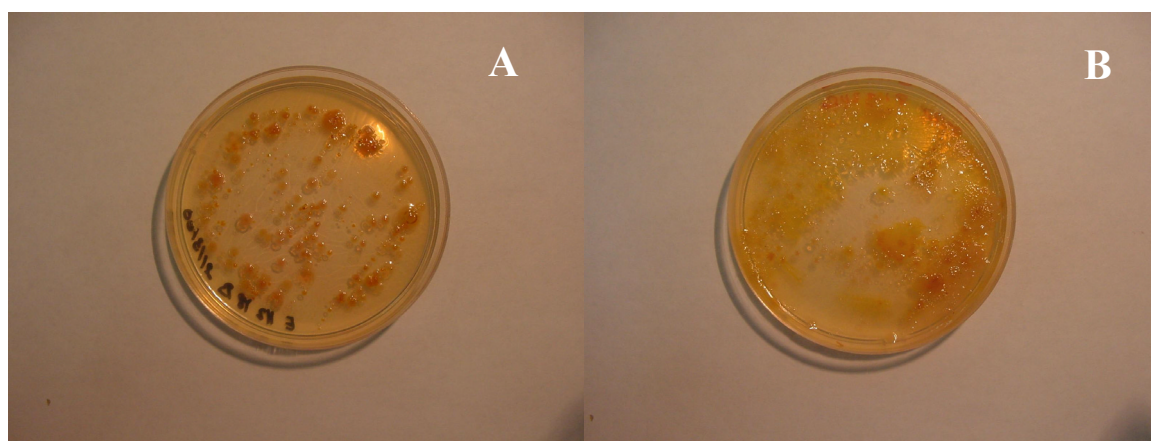
### 3.3.4. Evolución y caracterización de la población bacteriana durante la degradación del LAS

En general, la densidad de la población bacteriana presenta un ligero aumento a lo largo del periodo de aclimatación, y permanece prácticamente constante hasta el final del ensayo (Fig. 3.20). La densidad de microorganismos no ha presentado diferencias significativas entre los experimentos realizados con o sin inóculo (Tabla 3.21). Por tanto, la mayor capacidad de degradación en los ensayos con inóculo se debe a la presencia de determinadas cepas capaces de degradar el LAS y sus intermedios con mayor rapidez, más que al aumento de la densidad de microorganismos. De hecho Vives-Rego *et al.*, (1992) observaron que la degradación del LAS estaba correlacionada con la actividad bacteriana mas que con la densidad de microorganismos presentes en el sistema.



**Figura 3.20.** Evolución de la densidad de la población bacteriana, expresada como Unidades Formadoras de Colonia (UFC) a lo largo de distintos ensayos de biodegradación.

En este sentido, se ha apreciado un cambio cualitativo en la población bacteriana a lo largo del ensayo como se puede comprobar en la figura 3.21, donde se muestran las fotografías de dos placas de cultivo, una correspondiente a la población inicial propia del agua de mar (Fig. 3.21a), y la otra placa de la población transcurridas 100 horas de ensayo (Fig. 3.21b). El cultivo realizado con el agua de mar al comienzo del ensayo muestra una mayor diversidad (colonias de distinta forma y color) que el correspondiente al proceso en pleno desarrollo. Esta reducción en la diversidad se debe probablemente a los efectos tóxicos del LAS que puede tener sobre determinados microorganismos, o por la incapacidad de muchos de ellos de utilizar el LAS como fuente de carbono.



**Figura 3.21. Fotografías de placas de cultivo al principio (A) y después de 100h de experimento de degradación(B).**

La densidad inicial de la población bacteriana ha variado significativamente de unos experimentos a otros, por lo que claramente han podido influir en la evolución del proceso de degradación en cada uno de los muestreos. En general la densidad de población ha variado entre  $2.0 \cdot 10^4$  y  $6.0 \cdot 10^4$  UFC (Unidades Formadoras de Colonias). Sin embargo no se han detectado diferencias significativas en las densidades bacterianas de los distintos casos de un mismo ensayo.

También se ha analizado la concentración de nutrientes al principio y al final de algunos ensayos (Tablas 3.22<sup>a</sup> y 3.22b, correspondientes al ensayo C y D respectivamente), y se ha constatado que el nitrato puede ser limitante al final del

**Tabla 3.21. Densidad de bacterias inicial y media de cada experimento, expresada como unidades formadoras de colonias (UFC) en los distintos ensayos realizados, indicando las características más significativas de cada uno de ellos.**

ENSAYO	Homólogo	Inóculo	T(°C)	UFC ( $10^3$ ) $\pm$ S.D.	
				Inicial	Media ensayo
A	C <sub>12</sub> LAS I	Si	28	6.8	24.2 $\pm$ 8.6
B	C <sub>12</sub> LAS I	No	25	3.0	29.3 $\pm$ 6.9
B	C <sub>12</sub> LAS I	Si	25	2.3	29.2 $\pm$ 10.9
C	C <sub>12</sub> LAS I	No	25	17.2	19.6 $\pm$ 15.0
C	C <sub>12</sub> LAS I	Si	25	16.4	18.8 $\pm$ 6.6
C	C <sub>11</sub> LAS I	Si	25	12.6	24.6 $\pm$ 14.6
D	3 $\phi$ C <sub>11</sub> LAS	Si	25	14.7	23.6 $\pm$ 11.8
D	C <sub>12</sub> LAS II	Si	25	13.6	28.5 $\pm$ 16.9
E	3 $\phi$ C <sub>11</sub> LAS	Si	10	15.1	20.4 $\pm$ 12.5
E	C <sub>12</sub> LAS II	Si	10	14.1	25.3 $\pm$ 19.4
F	3 $\phi$ C <sub>11</sub> LAS	Si	25	13.1	49.4 $\pm$ 53.2
F	2 $\phi$ C <sub>12</sub> LAS	Si	25	25.2	41.5 $\pm$ 20.9

**Tabla 3.22(a). Concentración de nutrientes (fosfato, amonio, nitrato, nitrito y silicato) en el agua de mar al comienzo del ensayo (inicial), y al final de cada uno de los casos estudiados del ensayo C.**

Concentración nutrientes					
	Inicial	Final del ensayo			
		C <sub>12</sub> LAS sin inóculo	C <sub>12</sub> LAS con inóculo	C <sub>12</sub> LAS control	C <sub>11</sub> LAS con inóculo
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (μM)	0.37	0.28 $\pm$ 0.03	0.45 $\pm$ 0.11	0.74	0.49
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (μM)	0.88	2.93 $\pm$ 0.70	3.32 $\pm$ 1.83	1.01	1.16
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (μM)	0.26	n.d.	n.d.	0.23	n.d.
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (μM)	0.08	0.17 $\pm$ 0.03	0.13 $\pm$ 0.01	0.68	0.09
SiO <sub>2</sub> (μM)	1.22	32.63 $\pm$ 0.46	44.43 $\pm$ 18.31	51.88	37.58

proceso en estas condiciones, concretamente para todos los casos del ensayo C y para caso del experimento D realizado con C<sub>12</sub>LAS. Aunque por la rápida degradación detectada, los nutrientes no han debido afectar a la biodegradación del LAS que se produce en las primeras horas del ensayo, sin embargo puede que hayan reducido la biodegradación de los SPC que se prolonga varios días más. Por las diferencias de

concentración también se tiene constancia de la descomposición de parte de la microflora bacteriana, ya que la concentración de silicato disuelto aumenta de 5 a 30 veces respecto a la concentración inicial.

**Tabla 3.22(b). Concentración de nutrientes (fosfato, amonio, nitrato, nitrito y silicato) en el agua de mar al comienzo del ensayo (inicial), y al final de cada uno de los casos estudiados del ensayo D.**

Concentración de nutrientes					
	Inicial	Al final del ensayo			
		C <sub>11</sub> LAS con inóculo	C <sub>11</sub> LAS Control	C <sub>12</sub> LAS con inóculo	C <sub>12</sub> LAS Control
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (μM)	0.89	1.10±0.30	0.83	1.45±0.61	1.83
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (μM)	2.29	5.35±3.46	-	6.70±6.22	-
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (μM)	0.64	0.62±0.76	1.23	0.01±0.0	0.75
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (μM)	0.20	2.10±2.75	0.31	0.17±0.04	0.28
SiO <sub>2</sub> (μM)	4.80	22.62±6.19	21.72	24.09±0.64	21.42

Algunas de las cepas características de la biodegradación del LAS se han aislado e identificado, y se muestran en la tabla 3.23, indicando su índice de similitud (I.S) con determinadas especies bacterianas. El índice de similitud indica la fiabilidad de la identificación realizada, en función de las cepas que tiene como referencia. Un valor superior a 0.5 corresponde a una identificación precisa, y un valor inferior es mas bien especulativo. Las cepas identificadas pueden ser las responsables de la biodegradación del LAS puesto que las muestras se tomaron de las colonias más abundantes durante la fase exponencial del desarrollo. De hecho, algunas de las bacterias identificadas coinciden con otras descritas previamente en la bibliografía. *Pseudomonas sp.* y *Flavobacterium sp.*, junto con otra cepa, fueron aisladas e identificadas también durante la biodegradación del LAS en el medio marino por Sigoillot y Nguyen (1992), y constataron que eran capaces de degradar completamente el LAS. Al detectarlas de nuevo en este ensayo se corrobora la importancia de estas bacterias en la degradación del este compuesto en el medio marino. *Bacillus sp.* también ha sido identificada por Ginkel (1996) como responsable de la degradación del LAS. Además de las éstas se han detectado otras especies de bacterias que de una forma u otra pueden estar también

vinculadas a la biodegradación del LAS.

**Tabla 3.23. Cepas aisladas a partir del cultivo realizado durante la biodegradación del LAS (D11) e índice de similitud (I.S.) obtenido para cada caso. I.S. > 0.5 Identificación válida; 0.3<I.S.<0.5 identificación posible/presunta.**

Cepa identificada	Índice de Similitud
<i>Anthrobacter gloliformis</i>	0.661
<i>Micrococcus líale</i> (subgrupo A)	0.655
<i>Bacillus halodesnitrificans</i>	0.353
<i>Pseudomonas haloplanktis haloplanktis</i>	0.132
<i>Flavobacterium johnsoniae</i>	0.018

### 3.4. BIBLIOGRAFÍA

- Abe, S., Kobayashi, Y. 1985. Biodegradation of anionic surfactants with river die-away tests (part 3): effects of stirring and temperature on biodegradation rates. 36, 11:874-878.
- Angelidaki, I., Haagensen, F., Ahring, B.K. 2000. Anaerobic transformation of LAS in continuous stirred tank reactors treating sewage sludge. *The Cler Review, Research Technology Public Policy*, 6,1: 32-38.
- Baggi, G., Catelani, D., Galli, E., Treccani, V. 1972. The microbial degradation of phenylalkanes. *Biochem. J.*, 126: 1091-1107.
- Barbaro, J.R., Barker, J.F., Lemon, L.A., Mayfield, C.I. 1992. Biotransformation of BTEX under anaerobic, denitrifying conditions: field and laboratory observations. *J. Contam. Hydrol.*, 11: 245-272.
- Barcina, I., Lebaron, Pl., Vives-Rego, J. 1997. Survival of allochthonous bacteria in aquatic systems: a biological approach. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 23: 1.
- Bayona, J., Albaigés, J., Solanas, A., Grifoll, M. 1986. Selective aeróbic degradation of linear alkylbenzene by pure microbial cultures. *Chemosphere*, 15:595-598.
- Berna, J. L., Ferrer, J., Moreno, A., Prats, D., Ruiz Bevia, F. 1989. The fate of LAS in the environment. *Tenside Surfact. Det.*, 26, 2:101-107.
- Berna, J.L., Moreno, A., Ferrer, J. 1993. An assessment of the ultimate biodegradation of LAS. *Tenside Surfact. Det.*, 30,3.
- Bird, J.A., Cain, R.B. 1972. Metabolism of linear alkylbenzene sulphonates by a *Vibrio* Sp. *Biochem.*, J. 127: 46.
- Breen, A., Jimenez, L., Sayler, G. S., Federle, T. W. 1992. Plasmid incidence and LAS biodegradation in wastewater and pristine pond ecosystems. *J. Ind. Microbiol.*, 9: 37-44.
- Bressan, M., Brunetti, R., Casellato, S., Fava, G.C., Tosoni, L., Turchetto, M., Campesan, G.C.(1989). Effect of linear alkylbenzene sulfonate. (LAS) on benthic organisms. *Tenside Surfact. Det.*, 26: 148-158.
- Bruce, A.M., Swanwick, J.D., Ownsworth, R.A.1966. Syntethic detergenrs and sludge digestions: some recent observations. *J.Proc. Inst. Sew. Dpurif.*, 427-447.
- Buck, J.D.(1979). The plate count in aquatic microbiology. En S.W.Costerton y R.R. Colwell (eds), Native aquatic bacteria: enumeration, activity and ecology. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, 19-28.
- Cain, R.B., Willets, A.J., Bird, J.A.(1972). Surfactant biodegradation: metabolims and enzymology. En Biodegradation of Materials, Vol II (Eds. Waters, A.W., Hueck van der Plas,E.H.) Applied

Science Publishers, London. pp.136-144.

Cain, R.B. 1981. Microbial degradation of surfactants and builder components. En: Leisinger T., Cook, A.M., Gutter, R. y Nuesch J. (Eds.). Microbial degradation of xenobiotics and recalcitrant compounds. Academic Press Inc. New York, 326-370.

Cavalli, L., Gellera, A., Lazzarin, A., Nucci, G.C., Romano, P., Ranzani, M., Lorenzi, E. 1991. Linear alkylbenzene sulphonate removal and biodegradation in metropolitan plant for water treatment. *Riv. Ital. Sost. Gras.*, 68:75-81.

Cavalli, L., Gellera, A., Landone, A. 1993. LAS removal and biodegradation in a wastewater treatment plant. *Environ. Toxicol. Chem.*, 12: 1777-1788.

Cavalli, L., Cassani, G., Lazzarin, M., Maraschin, C., Nucci, G., Valtorta, L. 1996a. Iso-branching of LAS. *Tenside Surfact. Det.*, 33, 5:393-398.

Cavalli, L., Cassani, G., Lazzarin, M. 1996b. Biodegradation of LAS and alcohol ethoxylate (AE). Application of specific analytical methodologies. *Tenside Surfact. Det.*, 33, 2:158-165.

Cavalli, L.; Cassani, G., Maraschin, C. 1996c. LAS. Structure elucidation of the biodegradation intermediates. The CLER Review, vol. 2, Junio 1996: 4.

Chawla, G., Viswanathan, P.N., Devi, S. 1987. Biochemical studies on the toxicity of linear alkylbenzene sulfonate to *Scenedesmus quadricauda* in culture. *Environ. Exp. Bot.*, 3:311-323.

Coates, J.D., Anderson, R.T., Lovley, D.R. 1996. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 1099-1101.

Contzen, M., Wittich, R.M., Knackmuss, J., Stolz, A. 1996. Degradation of benzene 1,3-disulfonate by a mixed bacterial culture. *FEMS Microbiol. Lett.*, 136: 45-50.

Cook, A.M., Hrsak, D. 2000. The complete degradation of LAS is becoming better understood with pure cultures of bacteria. The Cler Review, Research Technology Public Policy, 6,1: 46-53.

Davis, E.M., Gloyna, E.F. 1969. Anionic and nonionic surfactant sorption and degradation by algae cultures. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 46: 604-608.

DeIvals, T.A., Lubián, L.M., González-delValle.M.A., Forja, J.M. 1996. Evaluating decline parameters of rotifer *Brachionus plicatilis* populations as an interstitial water toxicity bioassay. *Hidrobiologia*, 341: 159-167.

Devescopi, M., Hrisk, D., Fuks, D.(1986). Biodegradation kinetics of linear alkylbenzene sulphonate (LAS) in sea water. *Rapp. Comm. Int. Mer. Medit.*, 30:31.

Di Corcia, A., Samperi, R., Marcomini, A. 1994. Monitoring aromatic surfactants and their biodegradation intermediates in raw and treated sewages by solid-phase extraction and liquid chromatography. *Environ. Sci. Technol.*, 28: 850-858.

Di Corcia, A., Casassa, F., Crescenzi, C., Marcomini, A., Samperi, R. 1999a. Investigation of the

fate of linear alkyl benzenesulfonates and coproducts in a laboratory biodegradation test by using liquid chromatography/mass spectrometry. *Environ. Sci. Technol.*, 33, 22:4112-4118.

Di Corcia, A., Capuani, L., Casassa, F., Marcomini, A., Samperi, R. 1999b. Fate of linear alkyl benzenesulfonates, coproducts, and their metabolites in sewage treatment plants and in receiving river waters. *Environ. Sci. Technol.*, 33, 22:4119-4125.

Divo, C., Cardini, G. 1980. Primary and total biodegradation of LAS. *Tenside Det.*, 17, 1:30-36.

Dörfler, U., Haala, R., Matthies, M., Scheunert, I. 1996. Mineralization kinetics of chemicals in soils in relation to environmental conditions. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 34: 216-222.

Edwards, E.A., Grbic-Galic, D. 1992. Complete Mineralization of Benzene by Aquifer Microorganisms Under Strictly Anaerobic Conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58:2663-2666.

Federle, T. W., Schwab, B. S. 1992. Mineralization of surfactants in anaerobic sediments of a laundromat wastewater pond. *Wat. Res.*, 26, 1:123-127.

Feigel, B.J., Knackmuss, H.J. 1993. Syntropic interactions during degradation of 4-aminobenzenesulfonic acid by a two species bacterial culture. *Arch. Microbiol.*, 159:124-130.

Feitjel, T., Vits, H., Murray-Smith, R., van Wijk, R., Schröder, R., Birch, R., Ten Berge, W. 1996. Fate of LAS in activated sludge wastewater treatment plants: a model verification study. *Chemosphere*, 32, 7:1413-1426.

Field, J. A., Leenheer, J. A., Thorn, K. A., Barber, L. Jr., Rostad, C., Macalady, D. L., Daniel, S. R. 1992a. Identification of persistent anionic surfactant-derived chemicals in sewage effluent and groundwater. *J. Contam. Hydrol.*, 9: 55-78.

Field, J. A., Barber, L. B., Thurman, E. M., Moore, B. L., Lawrence, D. L., Peake, D. A. 1992b. Fate of ABS and DATS in sewage-contaminated groundwater. *Environ. Sci. Technol.*, 26, 6:1140-1148.

Focht, D.D., Williams, F.D. 1970. The degradation of p-toluenesulphonate by a *Pseudomonas*, *Can. J. Microbiol.*, 16:309-316.

Gerike, P., Fisher, W.K. 1981. A correlation study of biodegradability determinations of various chemicals in various tests. II. Additional results and conclusions. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 5:45-55.

Gerike, P., Jasiak, W. 1986. How completely are surfactants biodegraded?. *Tenside Det.*, 23, 6:300-304.

Giger, W., Brunner, P.H., Ahel, M., McEvoy, J., Marcomini, A., Schaffner, C. 1987 Organic detergent components and their degradation products in waste water and sludge. *Gas Wasser Abwasser*, 67: 111-122.

Giger, W., Alder, A. C., Brunner, P. H., Marcomini, A., Siegrist, H. 1989. Behaviour of LAS in sewage and sludge treatment and in sludge-treated soil. *Tenside Surfact. Det.*, 26, 2:95-100.



- Ginkel, C. G. 1996. Complete degradation of xenobiotic surfactants by consortia of aerobic microorganisms. *Biodegr.*, 7, 151-164.
- Gledhill, W.E. 1987. Microbial toxicity and degradation test methodology: An industrial perspective. *Toxicol. Assess.*, 2: 89.
- González-Mazo, E., Honing, M., Barceló, D., Gómez-Parra, A. 1997a. Monitoring long-chain intermediate products from the degradation of linear alkylbenzene sulfonates in the marine environment by solid-phase extraction followed by liquid chromatography/iospray mass spectrometry. *Environ. Sci. Technol.*, 31, 2:504-510.
- González-Mazo, E., Quiroga, J. M., Sales, D., Gómez-Parra, A. 1997b. Levels of linear alkylbenzenesulfonate (LAS) in waters and sediments of the coastal ecosystems of the Gulf of Cadiz. *Toxicol. Environ. Chem.*, 59: 77-87.
- González-Mazo, E., Forja, J. M., Gómez-Parra, A. 1998. Fate and distribution of linear alkylbenzene sulfonates in the littoral environment. *Environ. Sci. Technol.*, 32, 11:1636-1641.
- Grbic-Galic, D., Vogel. 1987. Transformation of toluene and benzene by mixed methanogenic cultures. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53: 254-260.
- Holt, M. S., Bernstein, S. L. 1992. LAS in sewage sludges and sludge amended soils. *Wat. Res.*, 26, 5:613-624.
- Holt, M. S., Fox, K. K., Burford, M., Daniel, M., Buckland, H. 1998. UK monitoring study on the removal of linear alkylbenzene sulphonate in trickling filter type sewage treatment plants. Contribution to GREAT-ER project#2. *Sci. Total Environ.*, 210/211: 255-269.
- Hon-nami, H., Hanya, T. 1980. LAS in river, estuary and bay water. *Wat. Res.* 41: 1251-1256.
- Hrsak, D., Johanides, V., Starcevic. 1976. Changes in mixed bacterial population during linear alkylbenzenesulphonate (LAS) biodegradation. 7<sup>th</sup> International Congress on Surface Active Substances. Paper No. 256, D1, Moscú, 12-18 Sept 1976.
- Hrsak, D., Bosnjak, M., Johanides, V. 1981. Kinetics of LAS and secondary alkane sulphonate biodegradarion. *Tenside Surfact. Det.*, 18, 3:137-140
- Hrsak, D., Grbic-Galic, D. 1995. Biodegradation of LAS by mixed methanotrophic-heterotrophic cultures. *J. Appl. Bacteriol.*, 78: 487-494.
- Hrsak, D. 1995. Biodegradation of undecylbenzenesulphonate by mixed methane-oxidizing culture. *Environmental Pollution.*, 89, 3:285-292.
- Hrsak, D. 1996. Cometabolic transformation of LAS by methanotrophs. *Wat. Res.*, 30, 12:3092-3098.
- Hrsak, D., Begonja, A. 1998. Growth characteristics and metabolic activities of the methanotrophic-heterotrophic groundwater community. *J. Appl. Microbiol.*, 85: 448-456.

- Monod, J. 1949. The growth of bacterial cultures. *Annu. Rev. Microbiol.*, 3:371-394.
- Huddleston, R.L., Allred, R.C. (1963). Microbial oxidation of sulfonates alkylbenzenes, *Dev. Ind. Microbiol.*, 4: 24-38.
- Huddleston, R.L., Nielsen, A.M. (1979). LAS biodegradation: The fate of aromatic ring. *Soap Cosmet. Chem Spec.*, 55, 3: 34-44.
- Janicke, W., Hilge, G. 1979. Biodegradability of anionic/cationic surfactant complexes under aerobic and anaerobic conditions of waste water and sludge treatment. *Tenside Surfact.*, 16:472-482.
- Jiménez, L., Breen, A., Thomas, N., Federle, T.W., Sayler, G.S. 1991. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75:1566-1569.
- Kazumi, J., Caldwell, M. E., Suflita, J. M., Lovley, D. R., Young, L. Y. 1997. Anaerobic degradation of benzene in diverse anoxic environments. *Environ. Sci. Technol.*, 31, 3:813-818.
- Kertesz, M. A., Kölbener, P., Stockinger, H., Beil, S., Cook, A. M. 1994. Desulfonation of LAS and related compounds by bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60: 2296-2303.
- Knaebel, D.B., Federle, T.W., Vestal, J.R. 1990. Mineralization of linear alkylbenzene sulfonate and linear alcohol ethoxylate in 11 contrasting soils. *Environ. Toxicol. Chem.*, 9:981-989.
- Knaebel, D.B., Federle, T.W., McAvoy, D.C., Vestal, J.R. 1994. Effect of mineral and organic soil constituents on microbial mineralisation of organic compounds in a natural soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60: 4500-4508.
- Knepper, T. P., Kruse, M. 2000. Investigations into the formation of sulfophenylcarboxylates (SPC) from linear alkylbenzenesulfonates (LAS) by liquid chromatography/mass spectrometry. *Tenside Surfact. Det.*, 37, 1:41-47.
- Kölbener, P., Ritter, A., Corradini, F., Baumann, U., Cook, A. M. 1996. Refractory organic carbon and sulfur in the biotransformed by-products in commercial LAS. Identifications of arylsulfonates. *Tenside Surfact. Det.*, 33, 2:149-156.
- Kölbener, P., Baumann, U., Leisinger, T., Cook, A. M. 1995a. Nondegraded metabolites arising from the biodegradation of commercial LAS surfactants in a laboratory trickling filter. *Environ. Toxicol. Chem.*, 14, 4:561-569.
- Kölbener, P., Baumann, U., Leisinger, T., Cook, A. M. 1995b. LAS surfactants in a simple test to detect refractory organic carbon (ROC): attribution of realcitrants to impurities in LAS. *Environ. Toxicol. Chem.*, 14, 4:571-577.
- Konopka, A., Zakharova, T., Oliver, L., Camp, D., Turco, R. F. 1996. Biodegradation of organic wastes containing surfactants in a biomass recycle reactor. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 9:3292-3297.

- Krueger, C. J., Radakovich, K. M., Sawyer, T. E., Barber, L. B., Smith, R. L., Field, J. A. 1998. Biodegradation of the surfactant linear alkylbenzenesulfonate in sewage-contaminated groundwater: a comparison of column experiments and tracer tests. *Environ. Sci. Technol.*, 32, 24:3954-3961.
- Larson, R. J., Payne, A. G. 1981. Fate of the benzene ring of LAS in natural waters. *Appl. Environ. Microbiol.*, 621-627.
- Larson, R. J., de Henau, H. 1988. Fate of LAS in aquatic, benthic and terrestrial environments.
- Larson, R. J., Federle, T. W., Shimp, R. J., Ventullo, R.M. 1989. Behaviour of LAS in soil infiltration and groundwater. *Tenside Surfact. Det.*, 26, 2:116-121.
- Larson, R. J. 1990. Structure-activity relationships for biodegradation of LAS. *Environ. Sci. Technol.*, 24, 8:1241-1246.
- Larson, R. J., Rothgeb, T. M., Shimp, R. J., Ward, T. E., Ventullo, R.M. 1993. Kinetics and practical significance of biodegradation of LAS in the environment. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 70, 7:645-657.
- Lewis, M.A. 1991. Chronic and sublethal toxicities of surfactants to aquatic animals: a review and risk assessment. *Wat. Res.*, 25: 101-113.
- Lovley, D.R., Coates, J.D., Woodward, J.C., Phillips, E.J.P. 1995. Benzene oxidation coupled to sulfate reduction. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61:953-958.
- Mampel, J., Hitzler, T., Ritter, A., Cook, A. M. 1998. Desulfonation of biotransformation products from commercial linear alkylbenzenesulfonates. *Environ. Toxicol. Chem.*, 17, 10:1960-1963.
- Marcomini, A., Giger, W. 1988. Behaviour of LAS in sewage treatment. *Tenside Surfact. Det.*, 25, 4:226-229.
- McEvoy, J., Giger, W. 1986. Determination of LAS in sewage sludge by High-Resolution Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *Environ. Sci. Technol.*, 20, 4:376-383.
- Miura, K., Nishizawa, H. 1982. Biodegradation of surfactants in low dissolved oxygen environment.
- Monod, J. 1949. The growth of bacterial cultures. *Annu. Rev. Microbiol.*, 3:371-394.
- Moreno, A., Cohen, L., Berna, J.L. 1988. LAB composition influence on LAS. *Tenside Surfact. Det.*, 25: 216-222.
- Moreno, A., Ferrer, J., Berna, J.L. 1990. Biodegradability of LAS in a sewer system. *Tenside Surfact. Det.*, 27, 5: 312-315.
- Moreno, A., Ferrer, J.A. 1991. Toxicity towards *Daphnia* during biodegradation of various LAS. *Tenside Surfact. Det.*, 28: 129.
- Moreno, A., Ferrer, J., Bravo, J., Berna, J. L., Cavalli, L. 1998. Effect of the alkyl chain and concentration of linear alkylbenzene sulfonate on biodegradation kinetics. *Tenside Surfact. Det.*, 35,

5:375-378.

Nielsen, A. M., Huddleston, R. L. 1981. Ultimate biodegradation of LAS alkyl and ring carbon. *Dev. Ind. Microbiol.*, 22.

Nielsen, A.M., Britton, L.N., Russel, G.L., McCormick, T.P., Filler, P.A. 1993. Microbial mineralization of dialkyltetralin sulfonate (DATS) in soils and aquatic systems. Ecotoxicology and environmental chemistry- a global perspective, Lisboa, Portugal, Society of Environmental Toxicology and Chemistry.

Nielsen, A. M., Britton, L. N., Beall, C. E., McCormick, T. P., Russell, G. L. 1997. Biodegradation of coproducts of commercial linear alkylbenzene sulfonate. *Environ. Sci. Technol.*, 31, 12:3397-3404.

Oba, K., Yoshida, Y., Tomiyama, S.(1967). Biodegradation of synthetic detergents: I. Biodegradation of anionic surfactants under aerobic and anaerobic conditions. *Yukgaku*, 16. 517-523.

Painter, H. A., Zabel, T. 1989. The behaviour of LAS in sewage treatment. *Tenside Surfact. Det.*, 26, 2:108-115.

Painter, H.A. 1992. Anionic surfactants. Editado por O. Hutzinger, The Handbook of Environmental Chemistry, Springer-Verlag, Berlin, Germany, 1-41. ???

Perales, J.A., Manzano, M.A., Sales, D.; Quiroga, J.M. (1999a). Linear alkylbenzene sulphonates: biodegradability and isomeric composition. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 63: 94-100.

Perales, J.A., Manzano, M.A., Sales, D.; Quiroga, J.M. (1999b). Biodegradation of LAS in river water. *Int. Biodeter. Biodegr.*, 13:155-160.

Pérez García, M., Romero García, L. I., Quiroga Alonso, J. M., Sales Márquez, D. 1996. Influence of LAS on biodegradation kinetics. *Chem. Biochem. Eng. Q.*, 10, 2:75-82.

Prats, D., Rodríguez, M, Llamas, J.M., De la Muela, M.A., Ferrer, J., Moreno, A., Berna, J.L. 2000. The use of specific analytical methods to assess the anaerobic biodegradation of LAS. The Cler Review, Research Technology Public Policy, 6,1: 46-53.

Quiroga Alonso, J. M., Sales Márquez, D., Gómez Parra, A. 1989. Experimental evaluation of pollution potential of anionic surfactants in the marine environment. *Wat. Res.*, 23, 7:801-807.

Quiroga, J.M., Sales, D. 1990. Effect of temperature on kinetics of anionic surfactant in sea water. *J. Disper. Sci. Tech.*, 10(6): 773-784.

Quiroga Alonso, J. M., Sales Márquez, D. 1991. Surfactants biodegradation in seawater. *Tenside Surfact. Det.*, 28, 3:200-203.

Quiroga, J.M., Perales, J.A., Romero, L.I., Sales, D.1999. Biodegradation kinetics of surfactants in seawater. *Chemosphere*, 39, 11: 1957-1969.

- Rapaport, R.A., Eckhoff, W.S. 1990. Monitoring linear alkylbenzene sulfonate in the environment 1973-1986. *Environ. Toxicol. Chem.*, 9:1245-1257.
- Ratlidge, C. 1991. Bioquímica del crecimiento y metabolismo. En *Biotecnología Básica*, De. Acribia., S.A., Zaragoza, 11-55.
- Reinhard, M., Goodman, N.L., Barker, J.F. 1984. Occurrence and distribution of organic chemicals in two landfill leachate plumes. *Environ. Sci. Technol.*, 18:953-961.
- Roberts, D. W. 1991. Application of QSAR to biodegradation of LAS isomers and homologues. *Sci. Total Environ.*, 109/110: 301-306.
- Sales, E., Quiroga, J.M., Gómez-Parra, A., Establier, R., Flores, V. 1984. Cinética de la biodegradación de n-dodecil-benceno sulfonato sódico en agua y sedimentos de la Bahía de Cádiz. *Jorn. Com. Esp. Deterg.*, 15:89-103.
- Sales Márquez, D., Quiroga Alonso, J. M., Gómez-Parra, A. 1987. Primary biodegradation kinetics of anionic surfactants in marine environment. *Environ. Toxicol. Chem.*, 39: 385-392.
- Sanz, J.L., Rodríguez, M., Amils, R., Berna, J.L., Ferrer, J., Moreno, A. 1999. Anaerobic biodegradation of LAS (linear alkylbenzene sulfonate). Inhibition of the methanogenic process. *Rivista Ital. Sost. Gras.*, 76:307-311.
- Schleheck, D., Dong, W., Denger, K., Heinzle, E., Cook, A. M. 2000. An  $\alpha$ -proteobacterium converts linear alkylbenzenesulfonate surfactants into sulfophenylcarboxylates and linear alkyldiphenyletherdisulfonate surfactants into sulfodiphenylethercarboxylates. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 5:1911-1916.
- Schöberl, P. 1989. Basic principles of LAS biodegradation. *Tenside Surfact. Det.*, 26, 2:86-94.
- Schöberl, P. 1993. Biologischer Tensid-Abbau. En *Die Tenside*, Editado por K.Kosswig y H. Stache. Carl Hanser Verlag, Munich, 407-464.
- Schulz, S., Dong, W., Groth, U., Cook, A.M. 2000. Enantiomeric degradation of 2-(4-sulfophenyl)butyrate via 4-sulfocathecol in *Delftia acidovorans* SPB1. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66: 1905-1910.
- Scott, M.J., Jones, M.N. 2000. The biodegradation of surfactants in the environment. *Biochim. Biophys. Acta*, 1508:235-251.
- Servais, P., Vives-Rego, J., Billen, G. 1992. Survival and mortality of bacteria in natural environment, En: *Release of genetically engineered and other microorganisms*, edited by J.C. Fry and M.J. Day, Plant and Microbial Biotechnology Research Series, vol. 2., Series edited by J.M. Lynch, Cambridge University Press, Cambridge, 100-119.
- Shimp, R. J. 1989. LAS biodegradation in estuaries. *Tenside Surfact. Det.*, 26, 6:390-393.
- Shimp, R. J., Larson, R. J. 1996. Estimating the removal and biodegradation potential of

- radiolabeled organic chemicals in activated sludge. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 34: 85-93.
- Sigoillot, J. C., Nguyen, M. H. 1992. Complete oxidation of LAS by bacterial communities selected from coastal seawater. *Appl. Environ. Microbiol.*, April, 1308-1312.
- Smith, D. L. 1997. Impact of composition on the performance of sodium linear alkylbenzenesulfonate (NaLAS). *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 74, 7:837-845.
- Steber, J. 1979. Investigation of the biodegradation of 14 C ring-labelled linear alkylbenzene sulfonate in surface-water and sewage-treatment-plant models. *Tenside Surfact. Det.*, 16: 140-145.
- Swisher, R. D. 1963. Biodegradation of ABS in relation to chemical structure. *Journal WPCF.*, 877-892.
- Swisher, R. D. 1964. Transient intermediates in the biodegradation of straight chain alkylbenzene sulfonates (ABS). *J. Wat. Poll. Control Fed.*, 35:1557-1564.
- Swisher, R.D. 1972. Linear alkylbenzene sulfonate (LAS) benzene rings: biodegradation and acclimation studies. *Yakagaku*, 21: 130-142.
- Swisher, R. D. 1981. The problem of ultimate biodegradability of LAS: an extension. *Tenside Det.*, 18, 3:57-63.
- Swisher, R. D. 1987. Surfactant biodegradation. Chemical structure and primary biodegradation. *Surfactant Science Series*. Marcel Dekker Publ., New York., Vol. 18, 415-445.
- Takada, H., Ishiwatari, R. 1987. LABS in urban riverine environments in Tokyo: distribution, source and behavior. *Environ. Sci. Technol.*, 21, 9:875-883.
- Taylor, P.W., Nickless, G. 1979. Paired-ion high-performance liquid chromatography of partially biodegraded linear alkylbenzenesulphonate, *J. Chromatogr.*, 179: 259-269.
- Terzic, S., Hrsak, D., Ahel, M. 1992a. Primary biodegradation kinetics of LAS in estuarine waters. *Wat. Res.* 26, 5:585-591.
- Terzic, S., Hrsak, D., Ahel, M. 1992b. Enrichment and isolation of LAS degrading bacteria from estuarine and coastal waters. *Mar. Pollut. Bull.*, 24, 4:199-204.
- Trehy, M. L., Gledhill, W. E., Orth, G. 1990. Determination of LAS and dialkyltetralinsulfonates in water and sediment by GC/MS. *Anal. Chem.*, 62:2581-2586.
- Trehy, M.L., Gledhill, W.E., Mieure, J.P., Adamove, J.E., Nielsen, A.M., Perkins, H.O., Eckhoff, W.S. 1996. Environmental monitoring for linear alkylbenzene sulfonates, dialkyltetralin sulfonates and their biodegradation intermediates. *Environ. Toxicol. Chem.*, 15: 233-240.
- Verge, C., Moreno, A., Bravo, J., Berna, J.L. 2001. Influence of water hardness on the bioavailability and toxicity of linear alkylbenzene (LAS). *Chemosphere* (en prensa).
- Vives-Rego, J., Vaqué, M. D., Sánchez Leal, J., Parra, J. L. 1987. Surfactants biodegradation in

sea water. *Tenside Surfact. Det.*, 24, 1:20-22.

Vives-Rego, J., Sánchez Leal, J., Martínez, J., González, J. 1992. Bacterial populations and the effect of phosphorus concentration in LAS degradation by the OECD screening method. *Microbios.*, 69: 187-193.

Vives-Rego, J., López-Amorós, R., Guindulain, T., García, M. T., Comas, J., Sánchez-Leal, J. 2000. Microbial aspects of linear alkylbenzene sulfonate degradation in coastal water. *J. Surfact. Det.*, 3: 303-308.

Ward, D.M., Atlas, R.M., Boehn, P.D., Calder, J.A. 1980. Microbial biodegradation and the chemical evolution of Amoco Cadiz oil pollutants. *Ambio*, 9: 277-283.

Ward, T. E. 1986. Biodegradation of LAS and model chemicals in aerobic and anaerobic sewage treatment processes and sludge amended soils. 7th Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry, noviembre, Arlington, Virginia.

Ward, T.E., Larson, R. 1989. Biodegradation kinetics of linear alkylbenzene sulfonates in sludge-amended agricultural soils. Ecotoxicology and environmental safety J. Ecotoxicol. *Environ. Saf.*, 17: 119-130.

Waters, J., Holt., M.S., Matthijs, E. 1989. Fate of LAS in sludge amended soils. *Tenside Surfact. Det.*, 26, 129-135.

White, G.F.; Russell, N.J. 1994. Biodegradation of anionic surfactants and related molecules. In Biochemistry of microbial degradation, Edited by Ratledge C. Kluwer, Dordrecht, pp. 143-177.

Willems, A.J., Cain, R.B. 1972. Microbial metabolism of alkylbenzene sulphonates. Fungal metabolism of 1-phenylundecano-p-sulphonate and 1-phenyldodecano-p-sulphonate. *Antonie van Leeuwenhoek* 39:585-597.

Wilson, B.H., Smith, G.B., Rees, J.F. 1986. Biotransformations of selected alkylbenzenes and halogenated aliphatic hydrocarbons in methanogenic aquifer material - A microcosm study. *Environ. Sci. Technol.*, 20, 997-1002.

Yan, G.A., Jiang, J.W., Wu, G., Yan, X. 1998. Disappearance of linear alkylbenzene sulfonate from different cultures with *Anabaena* sp. HB 1017. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 60: 329-334.

#### **4. ADSORCIÓN DEL ALQUILBENCENO LINEAL SULFONATO (LAS) Y SUS INTERMEDIOS DE DEGRADACIÓN EN SEDIMENTOS MARINOS**



#### 4.1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS

El comportamiento y el destino de las sustancias orgánicas en el medio acuático viene condicionado en gran medida por su capacidad de adsorción. La extensión con la que se produce este proceso determina, en último término, su distribución entre los distintos compartimentos ambientales y con ello, su transporte, reactividad y biodisponibilidad. La adsorción afecta de una manera especial a las sustancias con carácter tensioactivo, como es el caso del LAS, que presenta una acusada tendencia a acumularse en las interfases, especialmente en la que presentan los sedimentos en suspensión (Ferrer *et al.*, 1997; González-Mazo *et al.*, 1998). Las características de su adsorción han sido estudiadas tanto en aguas continentales (Matthijs y De Henau, 1985; Hand y Williams, 1987; Fytianos *et al.*, 1998b) como marinas (Rubio *et al.*, 1996; Fytianos *et al.*, 1998a). En agua de mar, donde la solubilidad del LAS es menor debido a la elevada concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  existente (Cohen *et al.*, 1993), se ha puesto de manifiesto que la adsorción aumenta de manera muy acusada con la salinidad (Rubio *et al.*, 1996). Esto supone una importante diferencia entre el comportamiento del LAS en los sistemas acuáticos continentales y los costeros.

Algunos autores han determinado coeficientes de partición para LAS en el medio natural (Tabla 4.1). Los valores presentan una gran variabilidad, debido principalmente a las características del sedimento, consideradas especialmente en lo que respecta a granulometría, concentración de sólidos en suspensión, contenido en materia orgánica, y las propiedades fisicoquímicas del medio, sobre todo el pH y la fuerza iónica. Habitualmente, se suele normalizar el coeficiente de partición utilizando el contenido en carbono orgánico (Karickhoff *et al.*, 1979). Aun procediendo de esta manera, los valores correspondientes a distintos sistemas no resultan comparables. Los procesos que ocurren en el ambiente de forma simultánea a la adsorción (principalmente biodegradación en la columna de agua y precipitación) influyen también sobre la distribución de LAS entre ambas fases. Además, los coeficientes de partición obtenidos para LAS, carecen del rigor con el que se establecen las propiedades químicas de las sustancias, debido a que el LAS presente en el medio es una mezcla variable de diferentes homólogos con distinta hidrofobicidad.

En cualquier caso, los valores de su distribución ambiental pueden ser considerados válidos como primera aproximación al conocimiento de los procesos de adsorción. En general, los coeficientes de partición en el medio ambiente son elevados,

mostrando una clara afinidad del tensioactivo por la fase sólida en suspensión. Los valores obtenidos en la columna de agua (sólidos en suspensión/agua) son superiores, incluso en dos órdenes de magnitud, a los obtenidos en sedimento (sedimento/agua intersticial). Por tanto, el transporte de LAS se produce en gran medida asociado al material particulado, que sedimenta en las zonas del sistema acuático con menor energía cinética. Esto provoca una acumulación del LAS en los sedimentos, que alcanzan concentraciones de hasta tres órdenes de magnitud superiores a las encontradas en disolución (González-Mazo *et al.*, 1998).

**Tabla 4.1. Coeficiente de partición del LAS ( $K_d$ ), expresado como cociente entre la concentración de LAS en sedimento y la concentración en agua, para distintos sistemas naturales.**

Compartimento	$K_d$ ( $L \cdot kg^{-1}$ )	Referencia
Sedimento de río	100-2600	Tabor y Barber, 1996
Sedimento de río	1000-5900	Hand <i>et al.</i> , 1990
Sedimento y sólidos en suspensión (lago)	500-14000	Amano y Fukushima, 1993
Sólidos en suspensión (estuario)	500-7000	Terzic y Ahel, 1994
Sedimento marino	100-2216	González-Mazo <i>et al.</i> , 1997b
Sólidos en suspensión (mar)	3500-13000	González-Mazo <i>et al.</i> , 1998

El estudio del proceso de adsorción ha concitado un interés creciente debido al elevado consumo de LAS y las altas concentraciones detectadas en sedimentos. Por ello, la adsorción del LAS ha sido ampliamente estudiada tanto en sistemas continentales (Hand y Williams, 1987; Matthijs y De Henau, 1985; Westall., *et al.*, 1999) como en plantas de tratamiento de aguas residuales (Prats *et al.*, 1993). No obstante, en el medio marino ha recibido menor atención y son escasas las publicaciones al respecto (e.g.: Rubio *et al.*, 1996; Fytianos *et al.*, 1998a). Los datos publicados acerca de la reversibilidad del proceso son también escasos y además discrepantes, ya que sugieren desde una completa reversibilidad (Hand y Williams, 1987; House y Farr, 1989; Westall *et al.*, 1999) hasta una irreversibilidad considerable (Matthijs y DeHenau, 1985; Rubio *et al.*, 1996). La caracterización de este proceso es de especial relevancia teniendo en cuenta que está claramente relacionado con la biodisponibilidad del tensioactivo, que podría verse reducida debido a la adsorción (Giger *et al.*, 1989).

La adsorción de una molécula en disolución sobre material particulado (Westall, 1987) es consecuencia de mecanismos de interacción entre el adsorbente y el adsorbato que implican desde reacciones químicas (hidrólisis, complejación, intercambio de ligandos o enlaces por puentes de hidrógeno) hasta interacciones de tipo físico (electrostáticas o de polarización), y de mecanismos de interacción entre el adsorbato y el disolvente (repulsión hidrófoba) u otras especies disueltas. Por tanto, el proceso global de adsorción está determinado por la estructura molecular del adsorbato, las características del adsorbente, y por las condiciones fisicoquímicas/ambientales (temperatura, agitación, fuerza iónica) en las que se desarrolla el proceso. El elevado número de variables implicadas hace difícil la interpretación de las características de la adsorción del LAS en muestras ambientales.

#### 4.1.1. Caracterización en experimentos de laboratorio

Los experimentos de adsorción en laboratorio se utilizan para determinar la afinidad de un compuesto entre la fase líquida y la sólida, en ausencia de otros procesos implicados (biodegradación, precipitación,...) bajo condiciones controladas (pH, temperatura, fuerza iónica,...). Los estudios cinéticos realizados para estimar el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio de adsorción indican que este se alcanza antes de las 6 horas (Tabla 4.2). En este plazo, la degradación apenas tiene lugar, por lo que no interfiere en el estudio de este proceso. Sin embargo estudios recientes han mostrado tanto para otros tensioactivos (Cano y Dorn, 1996) como para el LAS (Somasundaran y Huang, 1997; Dao *et al.*, 1998) que el equilibrio se alcanza en un tiempo superior a 12 horas, aunque efectivamente el 80-90% de la adsorción se desarrolla durante las primeras horas.

Al igual que se ha encontrado para el reparto del LAS entre la fase sólida y la disuelta en el medio natural, los resultados obtenidos para su adsorción en ensayos realizados en el laboratorio con distintos adsorbentes muestran una gran variabilidad (Tabla 4.3). Los valores del coeficiente de partición oscilan entre 1 y 7400 L·Kg<sup>-1</sup> dependiendo de la naturaleza del adsorbente y de las condiciones en las que se desarrolla el proceso (Tabla 4.3). De hecho, Amano *et al.*, (1989) obtuvieron valores de  $K$  de la ecuación de Freundlich ( $n=1.75$ ), en sedimentos y sólidos en suspensión de ríos y lagos, que variaron cerca de un orden de magnitud de unos casos a otros.

**Tabla 4.2. Tiempo de equilibrio en ensayos de adsorción de LAS con distintos adsorbentes.**

Sustrato	Tiempo equilibrio(h)	Referencia
Alúmina y caolinita	15	Somasundaran y Huang, 1997
Alúmina	48	Dao <i>et al.</i> , 1998
Suelo	0.7	Ou <i>et al.</i> , 1996
Sedimento	0.3	Marchesi <i>et al.</i> , 1991
EPA-16	4	Westall <i>et al.</i> , 1999
Sedimento de lago	0.5 - 1	Amano y Fukushima, 1993
Sedimento de río	4	Matthijs y De Henau, 1985
Sedimento de río	3 - 8	Hand y Williams, 1987
Sedimento marino	4	Rubio <i>et al.</i> , 1996
Sedimento marino	4	Fytianos <i>et al.</i> , 1998a

**Tabla 4.3. Coeficientes de reparto (Kd) del LAS en distintos compartimentos ambientales.**

Compartimento	Kd (L·kg <sup>-1</sup> )	Referencia
Sólidos en suspensión (río)	6115-7416	Amano <i>et al.</i> , 1989
Sedimento de río	1470-4340	Matthijs y De Henau, 1985
Sedimento marino	22.3-208	Fytianos <i>et al.</i> , 1998 <sup>a</sup>

Numerosos experimentos han puesto de manifiesto que la interacción hidrófoba es el principal responsable del proceso de adsorción del LAS sobre sedimentos o suelos (Hand y Williams, 1987; Rubio *et al.*, 1996; Amano y Fukushima, 1993; Westall *et al.*, 1999). Esta conclusión se alcanzó tras observar el aumento de la adsorción para los homólogos de cadena más larga y para los isómeros con fragmentos alquílicos más largos (isómeros externos).

En la tabla 4.4 se muestran los coeficientes de partición obtenidos para los distintos homólogos de LAS en diferentes matrices sólidas. Games (1982) encontró que el coeficiente de adsorción sobre lodos activos aumentaba unas 2.8 veces con cada grupo metileno. Una variación similar fue también observada para sedimentos de río y para lodos procedentes de plantas de tratamiento de aguas residuales, así como un aumento para los isómeros externos (Hand y Williams, 1987; Westall *et al.*, 1999;

Marcomini y Giger, 1988; Prats *et al.*, 1993), y también en sedimentos marinos (Rubio *et al.*, 1996). Los resultados obtenidos en el medio natural confirman lo observado en el laboratorio (Amano *et al.*, 1989; Amano y Fukushima, 1993; Brownawell *et al.*, 1991, González-Mazo *et al.*, 1997b, 1998). Teniendo en cuenta lo anterior, en el LAS adsorbido al sedimento predominan los homólogos de cadena más larga, de manera que en el medio acuático el LAS disuelto tendrá un peso molecular más bajo que la mezcla comercial (Hand y Williams, 1987; Rubio *et al.*, 1996, González-Mazo *et al.*, 1998).

**Tabla 4.4. Coeficiente de partición (Kd) para los distintos homólogos del LAS, sobre adsorbentes de distinta naturaleza.**

Adsorbente	Coeficiente de partición (L·Kg <sup>-1</sup> )					Referencia
	C <sub>10</sub> LAS	C <sub>11</sub> LAS	C <sub>12</sub> LAS	C <sub>13</sub> LAS	C <sub>14</sub> LAS	
Lodos activos	220	1000	3070	9330	-	Games, 1982
Sedimento EPA-16	15	-	77	-	709	Westall <i>et al.</i> , 1999
Sedimento de río	45	125	350	980	2390	Hand y Williams, 1987
Sedimento marino	96	142	655	1145	-	Rubio <i>et al.</i> , 1996

Sin embargo trabajos recientes muestran una adsorción inicial específica del LAS sobre centros iónicos del adsorbente, mediante fuerzas electrostáticas, y posteriormente una adsorción de tipo hidrófobo (Ou *et al.*, 1996). Según estos autores para concentraciones inferiores a 90ppm, la cantidad de LAS adsorbido es proporcional a su concentración en disolución. Los monómeros de LAS adsorbidos forman una monocapa (hemimicela) con su porción hidrófoba orientada hacia la fase acuosa (West y Harwell, 1992; Park y Jaffe, 1993). A concentraciones superiores, la adsorción aumenta exponencialmente como consecuencia de un mecanismo de adsorción cooperada (House y Farr, 1989). El aumento de la concentración de monómeros de LAS (carácter hidrófobo de la superficie) produce un aumento en la energía del sistema, que se estabiliza por agregación de otros monómeros a las hemimicelas para formar admicelas.

Teniendo en cuenta las interacciones electrostáticas específicas que puede presentar el LAS, a diferencia de otros compuestos hidrófobos neutros, el estudio de su adsorción no puede reducirse a un modelo hidrófobo simple. En ensayos de laboratorio también se han evaluado otras variables relacionadas con el tipo de adsorbente y con las características fisicoquímicas del medio. A continuación describimos brevemente las más importantes.

#### ***A. Concentración de sólidos en suspensión en la columna de agua, contenido en carbono orgánico y granulometría del sedimento***

El efecto de la concentración de sólidos en suspensión sobre la adsorción de LAS no está bien definido. Algunos autores (McAvoy *et al.*, 1994) no han observado variaciones significativas de la adsorción con la concentración de sólidos, sin embargo Di Toro *et al.*, (1990), en una revisión de datos experimentales, encontraron una disminución de la adsorción al aumentar la concentración de partículas.

En el mismo sentido, las investigaciones sobre la influencia del carbono orgánico son discrepantes. La mayoría de las investigaciones han encontrado una buena correlación entre la adsorción de LAS y el contenido en carbono orgánico del sedimento (Urano *et al.*, 1984; Matthijs y De Henau, 1985; Hand *et al.*, 1990; Amano y Fukushima, 1993; McAvoy *et al.*, 1994; Traina *et al.*, 1996; Fytianos *et al.*, 1998b; Westall *et al.*, 1999), sin embargo en ensayos realizados a concentraciones ambientalmente representativas, no se ha observado esta dependencia (Hand y Williams, 1987; Ou *et al.*, 1996). De hecho Ou *et al.*, (1996) observaron que la adsorción del LAS estaba favorecida al eliminar la materia orgánica del sedimento. En cualquier caso, se han obtenido relaciones empíricas entre el coeficiente de partición normalizado por el carbono orgánico ( $K_{oc}$ ), y el coeficiente de partición octanol/agua ( $K_{ow}$ ). Seth *et al.*, (1999) han propuesto la relación  $K_{oc}=0.35 \cdot K_{ow}$  para sustancias químicas con carácter hidrófobo. Los valores obtenidos constituirían sólo una información previa, ya que la adsorción del LAS es consecuencia tanto de interacciones hidrófobas como electrostáticas (Traina *et al.*, 1996).

## B. Fuerza iónica y pH

En ensayos de laboratorio utilizando tanto sedimentos continentales (Brownawell *et al.*, 1991) como marinos (Rubio *et al.*, 1996), se ha observado que la adsorción de LAS aumenta con la fuerza iónica del medio. Dicho efecto va a ser especialmente relevante en zonas estuáricas, debido al amplio intervalo de salinidad existente en este tipo de ecosistemas.

El efecto del pH tiene influencia sobre las reacciones químicas superficiales (complejación superficial o intercambio de ligandos, Inoue *et al.*, 1978) o sobre la consolidación del tipo de carga en la misma (interacciones electrostáticas). A pH bajos la superficie del adsorbente está cargada positivamente y se favorece la adsorción aniónica. La disminución del proceso de adsorción con el aumento del pH se ha observado tanto en sedimentos (Di Toro *et al.*, 1990; Brownawell *et al.*, 1991; Inoue *et al.*, 1978; Westall *et al.*, 1999, Dao *et al.*, 1998; Fytianos *et al.*, 1998b) como sobre la superficie externa de la biota (Fernández *et al.*, 1995).

## C. Contenido en iones y precipitación

El LAS, al igual que otras especies iónicas, interacciona con iones presentes en la superficie del adsorbente. Inoue *et al.*, (1978) observaron un aumento de la adsorción de LAS con el contenido en sesquióxidos de hierro y aluminio del adsorbente. También se ha observado la formación de complejos del LAS con cationes férricos (sustrato óxido férrico), y la existencia de una adsorción competitiva con otros aniones ( $\text{SO}_4^{2-}$  y  $\text{HPO}_4^{2-}$ ) (Dao *et al.*, 1998). Otros autores (Brownawell *et al.*, 1991; Traina *et al.*, 1996) describieron la existencia de interacciones electrostáticas y específicas, en particular con  $\text{Ca}^{2+}$ , y un aumento de la adsorción con el contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  (Westall *et al.*, 1999). El producto de solubilidad de  $\text{Ca}(\text{LAS})_2$  ( $K_{ps} = 21.8 \times 10^{-11} \text{ mol L}^{-3}$ ) varía notablemente con la fuerza iónica del medio y con la longitud de cadena (Berna *et al.*, 1989; Verge *et al.*, 2001). En el medio marino y debido a las altas concentraciones de calcio presente ( $10^{-2}\text{M}$ ), la precipitación va a tener especial incidencia en el proceso de adsorción. El LAS también puede formar un complejo con el ión calcio ( $\text{RSO}_3\text{Ca}^+$ ) que puede adsorberse sobre partículas de carga negativa (Mattheson *et al.*, 1985).

El LAS puede interaccionar también con otros iones, como el aluminio (Talens *et al.*, 1998), el magnesio (Cohen *et al.*, 1993) y con cationes metálicos (Beveridge y

Pickering, 1983). Recientemente se han observado efectos sinérgicos y competitivos en la adsorción sobre alúmina del LAS y los alcohol etoxilados, dependiendo de la proporción en que están presentes en disolución ambos tensioactivos (Somasundaran y Huang, 1997). La presencia de LAS puede aumentar también la movilidad de otros compuestos como la atrazina (Scheunert y Korte, 1985) o el fenantreno (Ou *et al.*, 1995). Esta propiedad se está aplicando para la recuperación de lodos y suelos contaminados.

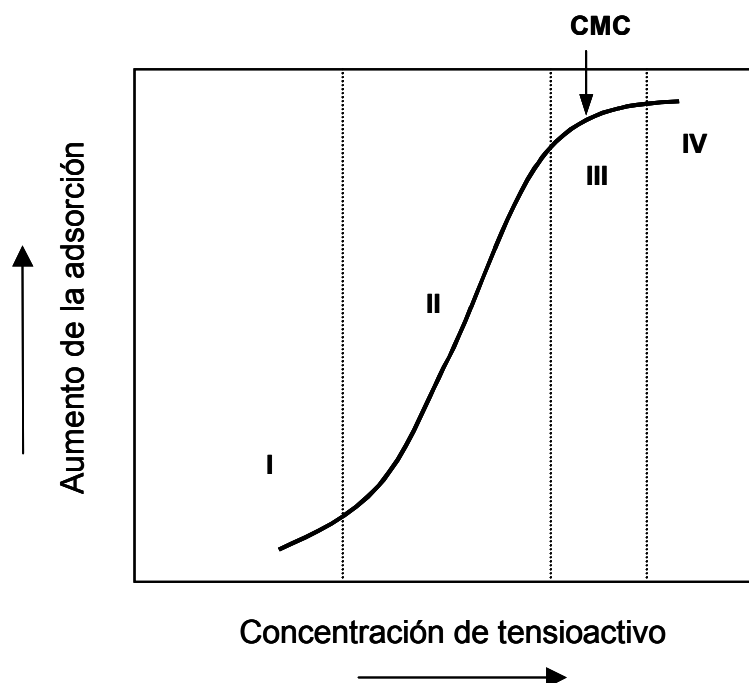
#### **4.1.2. Isotermas de adsorción**

La caracterización del proceso de adsorción se realiza a partir de la obtención de las isotermas de adsorción, que muestran la relación entre la concentración de adsorbato en disolución y la cantidad adsorbida a temperatura constante. La isoterma de un tensioactivo puede dividirse en 4 zonas o regiones (Fig. 5.1). A bajas concentraciones, donde se cumple la ley de Henry (región I), la adsorción se produce por monómeros asociados mediante interacciones electrostáticas con la superficie del adsorbente. Un rápido aumento en la adsorción tiene lugar en la región II, debido a la asociación de las moléculas de tensioactivo a través de interacciones laterales de las cadenas hidrocarbonadas (agregados bidimensionales en la superficie de adsorción). La pendiente disminuye en la región III hasta que finalmente se hace asintótica (región IV) como consecuencia de la existencia de concentraciones superiores a la concentración micelar crítica. Estas regiones han sido detectadas para el dodecilsulfato sódico (Chandar *et al.*, 1987) y para el LAS (Li y Ruckenstein, 1996).

A concentraciones de LAS inferiores a  $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , la adsorción sobre óxidos de Fe y Al es baja (región I). A mayor concentración, Matthijs y De Henau (1985), encontraron gran intensidad de adsorción sobre estos mismos óxidos (adsorción cooperada, región II). Las isotermas de adsorción de LAS sobre sedimentos naturales son generalmente no lineales, incluso a concentraciones muy bajas. En estos casos, su comportamiento se ajusta a la isoterma de Freundlich, adecuada para sólidos con superficie heterogénea (Matthijs y De Henau, 1985; Hand y Williams, 1987; Ou *et al.*, 1996; Westall *et al.*, 1999). La adsorción de LAS sobre sedimentos marinos se ha descrito satisfactoriamente a partir de esta isoterma, tanto para el LAS comercial (Rubio *et al.*, 1996, Fytianos *et al.*, 1998a), como para disoluciones equimoleculares o por separado de los distintos homólogos (Rubio *et al.*, 1996). Amano y Fukushima (1993) también encontraron un buen ajuste al modelo de Freundlich sobre sedimentos y sólidos en suspensión de ríos y lagos.



Recientemente Westall *et al.*, (1999) han propuesto la isoterma de virial-electrostática, que corresponde formalmente al modelo de Helmholtz o de capacitancia constante de la doble capa eléctrica.



**Figura 5.1. Diagrama que representa las distintas partes de una isoterma de adsorción típica de un tensioactivo.**

En los últimos años algunos trabajos han utilizado isothermas complejas que permiten considerar distintos procesos de adsorción que se desarrollan de forma simultánea. Las isothermas complejas usualmente se han definido como adición de las isothermas correspondientes a cada superficie de adsorción considerada. En este sentido se ha aplicado satisfactoriamente una isoterma de dos centros (suma de dos isothermas de Langmuir) para determinar la adsorción de Cu(II) a la superficie y a los exudados de la microalga *Dunaliella tertiolecta* en agua de mar (González-Davila *et al.*, 1995; Santana-Casiano *et al.*, 1995).

El modelo propuesto por Di Toro *et al.*, (1990) contempla un aumento en la adsorción de tensioactivos iónicos, a medida que su concentración micelar crítica es menor, y al aumentar el contenido en carbono orgánico o la capacidad de intercambio catiónico del sedimento. Recientemente Li y Ruckenstein (1996) han desarrollado un modelo que describe la adsorción de tensioactivos aniónicos sobre superficies cargadas. Este modelo está basado en la formación de una capa bidimensional no completa, en la

que se alternan en la superficie sólida, monómeros adsorbidos, agregados en monocapa o bicapa y centros vacíos. Este modelo explica muy bien el comportamiento de los tensioactivos iónicos en un gran intervalo de concentraciones, con desviaciones pequeñas respecto a los datos experimentales, sin embargo, su complejidad lo hace poco funcional y lamentablemente su mayor desviación respecto a los datos experimentales se produce a concentraciones ambientales.

Dentro del creciente interés en la determinación del mecanismo de adsorción de LAS sobre distintas matrices ambientales, debe señalarse que la manera de abordar el tema no ha sido siempre la más adecuada, debido fundamentalmente a lo siguiente: i) la mayoría de los experimentos se han realizado utilizando LAS comercial, ii) en el diseño de los mismos no se han tenido en cuenta aspectos fundamentales derivados del carácter tensioactivo de la sustancia, como son la representatividad de la muestra tomada del recipiente para su análisis, así como la posible adsorción sobre las paredes del mismo (salvo algunas excepciones: Hand y Williams, 1987; Westall *et al.*, 1999), iii) las concentraciones usadas son normalmente muy superiores a las encontradas en el medio natural y iv) no existe ningún estudio de la adsorción de los intermedios de degradación del LAS.

Teniendo en cuenta esto, se creyó necesario caracterizar el proceso de adsorción de los LAS y los SPC en sedimentos marinos a partir de ensayos de laboratorio que contemplasen: i) el trabajo con distintos homólogos puros, ii) la distribución no homogénea de LAS en el recipiente en el que se realiza el ensayo (representatividad de la muestra), iii) la caracterización del proceso de adsorción sobre las paredes del recipiente y iv) el trabajo a concentraciones ambientalmente representativas.

En este capítulo de la memoria se muestran los resultados obtenidos para los experimentos de laboratorio realizados con los principales homólogos de LAS ( $C_{10}$ - $C_{13}$ ) y los SPC de longitud de cadena equivalente ( $C_{10}$ - $C_{13}$ ) sobre sedimentos marinos. El trabajo experimental se diseñó de manera que se cumplieran los objetivos concretos que se indican a continuación.

## **OBJETIVOS**

1. Caracterizar cinéticamente la adsorción de C<sub>11</sub>LAS y C<sub>11</sub>SPC sobre sedimentos marinos para estimar el tiempo necesario para alcanzar el estado de equilibrio.
2. Establecer las isotermas de adsorción a distintas temperaturas para el C<sub>11</sub>LAS y el C<sub>11</sub>SPC a concentraciones ambientales sobre sedimentos marinos.
3. Caracterizar y cuantificar el artefacto que supone la inevitable adsorción sobre las paredes del recipiente con objeto de poder extrapolar los resultados obtenidos en el laboratorio a procesos ambientales.
4. Determinar el grado de reversibilidad de la adsorción de los homólogos del LAS de los SPC.
5. Caracterizar termodinámicamente el proceso, calculando los valores de  $\Delta H$ ,  $\Delta S$  y  $\Delta G$ .

## 4.2. MATERIAL Y MÉTODOS

El agua y el sedimento marino utilizados en los ensayos de adsorción procedían de áreas exentas de contaminación. El agua se tomó a 1 metro de profundidad a más de 12 millas de la costa (Golfo de Cádiz), se filtró por 0.45  $\mu\text{m}$  (Whatmann GF/F) y se mantuvo a 4°C. Posteriormente fue filtrada por 0.22  $\mu\text{m}$  (Sterivac GP10, Millipore) para eliminar la flora bacteriana y, con ello, la posibilidad de se produjera la biodegradación durante el desarrollo de los experimentos. Las principales propiedades físicoquímicas del agua se muestran en la tabla 4.5.

**Tabla 4.5. Características físicoquímicas del agua utilizada en los ensayos de adsorción.**

Salinidad	36.249
pH	8.13
Alcalinidad (mM)	2.43
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mM)	2.10
LAS (mg·L <sup>-1</sup> )	n.d.
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> ( $\mu\text{M}$ )	0.79
SiO <sub>2</sub> ( $\mu\text{M}$ )	27.72
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ( $\mu\text{M}$ )	3.33
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ( $\mu\text{M}$ )	1.14
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ( $\mu\text{M}$ )	0.27
Ca <sup>2+</sup> (M)	10 <sup>-2</sup>
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (mM)	29.2
I (fuerza iónica, M)	0.750
n.d.: no detectado	

El sedimento se tomó de una antigua salina de la bahía de Cádiz, de una zona que había sido previamente dragada en más de dos metros, que posteriormente se mantuvo sin recibir agua, y por tanto, tampoco había recibido residuos urbanos o de otro tipo. El sedimento se secó a 80°C, se molturó y se pasó por un tamiz de 300  $\mu\text{m}$  de luz de malla. Sus principales características se muestran en la tabla 4.6.

Se pusieron en contacto 50 mL de agua de mar a la que se añadieron cantidades conocidas de LAS o SPC con 0.5 g de sedimento en tubos de centrifuga de polipropileno (Herolab, Wiesloch, Alemania) de unos 80 mL de capacidad. La adsorción sobre las

paredes del tubo de centrifuga se estimó de forma simultánea realizando ensayos sin sedimento (blancos). La continua interacción adsorbato-adsorbente se aseguró por medio de un agitador mecánico de brazos, ubicado en el interior de una cámara termostatzada ( $\pm 0.2^{\circ}\text{C}$ ), que se mantuvo en la oscuridad para minimizar la proliferación de fitoplancton.

**Tabla 4.6. Características principales del sedimento utilizado en los ensayos de adsorción.**

C orgánico (%)	1.47
N orgánico (%)	0.16
$\text{PO}_4^{3-}$ ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	1.67
Fe (%)	4.05
Mn ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	235
LAS ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	<0.05
Superficie específica ( $\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$ )	14.9
Diámetro medio de poro (nm)	3.5
Porosidad	0.76
Arcilla (%) (*)	3.0
Limo (%)	35.5
Arena (%) (**)	61.5

(\*) (calcita, illita y montmorillonita)  
(\*\*)(Sílice)

Una vez finalizado el ensayo se centrifugaron los tubos durante 30 minutos a  $2\cdot 10^4\text{g}$ . El agua sobrenadante se recuperó por decantación, y se fijó adicionando 1 mL de formaldehído (35%). La recuperación del agua superó el 99.3% para los blancos (sin sedimento) y el 98.2% para las muestras. Estos valores son superiores a los obtenidos en trabajos previos (90% por McAvoy *et al.*, 1994).

Para evitar problemas derivados de la representatividad de la muestra, teniendo en cuenta la distribución heterogénea del LAS en la disolución, se tomó la práctica totalidad de la disolución ( $\approx 50\text{ mL}$ ) para su análisis. Cada una de las muestras se ajustó a pH 3 adicionando HCl y se concentró por extracción en fase sólida a través de una minicolumna  $\text{C}_{18}$  previamente activada (10 mL MeOH y 10 mL  $\text{H}_2\text{O}$  a pH 3). Esta minicolumna se lavó con 6 mL de MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$  (30/70) y finalmente se eluyó con MeOH (10mL). El eluato obtenido se llevó a sequedad por arrastre de corriente de nitrógeno y calor, y por último, la fracción seca se redisolvió en 1mL de MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$  (80/20). Cada

serie de muestras se cuantificó usando cinco patrones externos de LAS o SPC en agua de mar sometidos al mismo tratamiento. La masa de adsorbato asociada a la fase sólida se ha calculado, en todos los casos, como diferencia entre la masa adicionada al comienzo del ensayo y la masa de adsorbato en disolución una vez alcanzado el equilibrio ( $m_0 - m_t$ ).

Los siguientes ensayos de adsorción fueron realizados:

#### **4.2.1. Estimación del tiempo de equilibrio**

Para estimar el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio de adsorción se han realizado ensayos usando  $C_{11}$ LAS y  $C_{11}$ SPC a  $200 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , bajo las condiciones cinéticas más restrictivas ( $5^\circ\text{C}$ ) durante 48 horas, tomando muestras a cortos intervalos de tiempo (0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24 y 48h).

#### **4.2.2. Ensayos de adsorción y desorción**

Las isotermas de adsorción sobre sedimento marino y sobre plástico de  $C_{11}$ LAS y  $C_{11}$ SPC se han realizado a distintas temperaturas ( $5$ - $25^\circ\text{C}$ ) y a concentraciones de 50, 100, 200, 400, 600 y  $1000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Para estudiar el efecto de la longitud de la cadena y del grupo carboxílico sobre el coeficiente de partición, se han realizado diferentes experimentos con homólogos de 10 a 13 átomos de carbono en la cadena hidrocarbonada de LAS y de SPC a  $15^\circ\text{C}$ , a la concentración de  $400 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de cada uno de ellos. La adsorción sobre el plástico se ha estimado utilizando blancos (sin sedimento) que se han tratado del mismo modo y de forma simultánea al resto de muestras. Los homólogos de LAS fueron suministrados por Petroquímica Española S.A., y su composición se muestra en la tabla 4.7.

De manera complementaria a los ensayos de adsorción se determinó el grado de reversibilidad de este proceso. Para cuantificar la desorción del LAS y el SPC se adicionaron 50 mL de agua de mar, libre de adsorbato, al tubo de centrifuga, una vez que se había retirado el agua sobrenadante procedente del ensayo de adsorción. Tras resuspender el sedimento se procedió de igual manera: se mantuvo la agitación y oscuridad en el interior de una cámara termostatzada ( $\pm 0.2^\circ\text{C}$ ) hasta que se alcanzó de

nuevo el equilibrio. A continuación se recuperó por decantación el agua sobrenadante tras la centrifugación y se procedió a su análisis.

**Tabla 4.7. Composición expresada en porcentaje en peso de los homólogos de LAS utilizados en los ensayos de adsorción.**

Patrón	Índice activo (%)	Pureza (%)	Composición isomérica (%)			
			2 $\phi$	3 $\phi$	4 $\phi$	5 $\phi$
C <sub>10</sub> LAS (*)	44.8	95				
C <sub>11</sub> LAS	15.05	98.7	10.8	73.8	13.3	0.8
C <sub>12</sub> LAS	33.0	98.9	86.8	12.1		
C <sub>13</sub> LAS (*)	45.7	95				

(\*) Composición isomérica desconocida

Los valores de  $\Delta H$ ,  $\Delta S$  y  $\Delta G$  del proceso de adsorción se han calculado a partir de la variación de la constante termodinámica de equilibrio ( $K_o$ ) a dilución infinita con la temperatura, según la aproximación propuesta por Biggar y Cheung (1973).

### 4.3. RESULTADOS

La elevada afinidad de numerosas sustancias por las superficies, como ocurre con el LAS, hace que en la obtención de sus isothermas de adsorción en el laboratorio, deba tenerse en cuenta el artefacto que supone su adsorción por la superficie de los recipientes en los que se realizan los experimentos. Esta adsorción, que es inevitable, modifica, en algunos casos en gran medida, la concentración nominal de adsorbato a la que se expone el adsorbente, por lo que de no tenerse en cuenta los resultados obtenidos son erróneos.

Para los ensayos de adsorción de LAS y SPC, que se describen en este apartado de la memoria, se probaron diversos recipientes de distinta forma y naturaleza. Por razones logísticas, debido fundamentalmente a que se pretendía realizar estudios de desorción con posterioridad a los de adsorción se optó por emplear tubos de centrifuga de polipropileno de alta densidad y 80mL de capacidad, que no habían sido utilizados con anterioridad. Estos tubos presentaban varias ventajas: permiten evitar la evaporación de la disolución al contar con un cierre roscado, tienen una superficie muy regular y facilitan las operaciones de separación del adsorbente de la fase líquida una vez alcanzado el equilibrio de adsorción.

La forma de corregir las isothermas de adsorción sobre el sedimento por la adsorción sobre el recipiente es fácil, bastaría con restar a la cantidad de LAS presente en la disolución en contacto con el sedimento la que se adsorbe sobre las paredes del tubo. Esto puede hacerse realizando un ensayo sin sedimento (blanco) en paralelo y/o con anterioridad a la obtención de las isothermas.

Esto implícitamente supone admitir que la adsorción sobre las paredes del tubo es la misma tanto si existe o no sedimento. Esta presunción no es obvia, ya que podría establecerse una adsorción competitiva sobre ambos adsorbentes, cuyo resultado final no fuera la suma de los dos procesos por separado. Por este motivo, se prefirió modelizar el proceso global de adsorción a través de una isoterma de dos centros, entendiendo que la distinta naturaleza del polipropileno y del sedimento presentan una afinidad sustancialmente diferente para el LAS.

El problema principal que surge en este caso es la forma de referir la adsorción sobre la pared del recipiente. En efecto no puede utilizarse una unidad de masa, ya que la adsorción sólo se produce sobre su superficie interna. Tampoco debe expresarse por

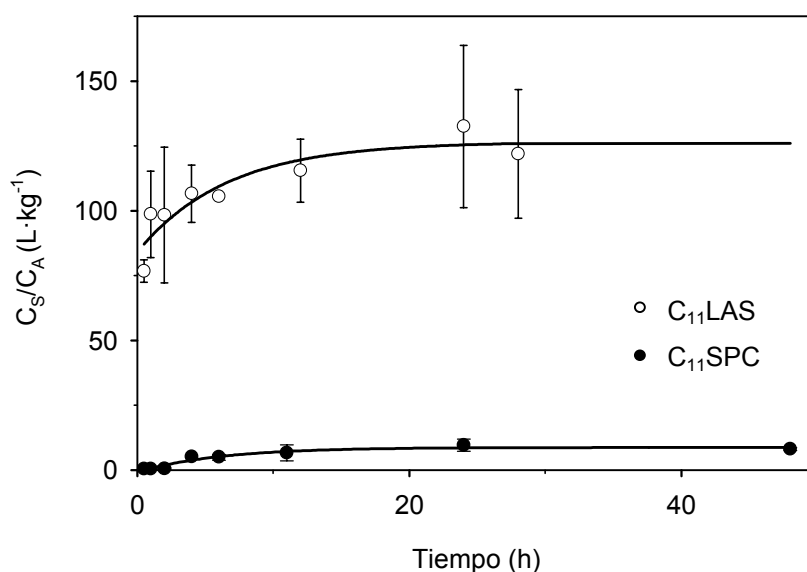


unidad de superficie mojada por la disolución, ya que ésta es indeterminable cuando los tubos de centrífuga se mantienen en agitación y, además, el valor de la superficie real de los recipientes se modifica a causa de las rayaduras que se producen cuando se usan. Por estos motivos se adoptó el “tubo” como unidad de medida para la adsorción que se produce sobre la pared del recipiente. Aunque conceptualmente carece de rigor, ya que los resultados que se presentan son sólo válidos para las condiciones experimentales que se han utilizado (y por tanto, de difícil constatación por otros autores), permite resolver el problema.

#### 4.3.1. Cinética del proceso de adsorción

En la figura 4.2 se muestra la variación con el tiempo del cociente entre la concentración de  $C_{11}$ LAS o  $C_{11}$ SPC en la fase sólida ( $C_s$ ) y en disolución ( $C_a$ ) a 5°C. El  $C_{11}$ LAS presenta una gran afinidad por la fase sólida, a diferencia de lo que ocurre para el  $C_{11}$ SPC, cuyas concentraciones son similares en ambas fases. La distribución del  $C_{11}$ LAS en las dos fases se estabiliza a partir de las 12 horas, tiempo superior al obtenido por otros autores (Tabla 4.4). Aunque la cinética de adsorción es más lenta sobre superficies heterogéneas (sedimento natural) que sobre homogéneas (Stum, 1992), en sedimentos naturales se han detectado tiempos de equilibrio inferiores a 6 horas. Sin embargo la elevada sensibilidad del método de análisis utilizado en esta memoria, ha permitido observar que el 80% de la adsorción se desarrolla durante las primeras 4 horas, tiempo similar al obtenido por otros autores para el proceso completo, y que son necesarias 8 horas más para alcanzar el estado de equilibrio. Cano y Dorn (1996) obtuvieron resultados similares para tensioactivos no iónicos (alcohol etoxilados) en sedimentos naturales. El 90% de adsorción se desarrolló en las primeras 2-4h, siendo necesarias un total de 24h para alcanzar el estado estacionario. Para el caso del  $C_{11}$ SPC la cinética es más lenta, y se requieren 24 horas para alcanzar el estado estacionario (Fig. 4.2), aunque en las primeras 6 horas se desarrolla el 80% de la adsorción.

Durante los ensayos de adsorción es conveniente evaluar la posible influencia de la degradación del compuesto (Fytianos *et al.*, 1998a). A pesar de su duración, en los experimentos realizados en el presente trabajo no se han detectado intermedios de degradación del compuesto original, ya que el agua había sido previamente esterilizada.



**Figura 4.2.** Variación con el tiempo de la razón entre la concentración de C<sub>11</sub>LAS o C<sub>11</sub>SPC en el sedimento y su concentración en agua ( $C_s/C_a$ ) a 5°C.

#### 4.3.2. Adsorción del p-undecilbenceno sulfonato (C<sub>11</sub>LAS) y del ácido p-sulfofenil-undecanoico (C<sub>11</sub>SPC) sobre la superficie del recipiente usado en los ensayos

Los datos de adsorción sobre el plástico se han ajustado a la isoterma de Langmuir:

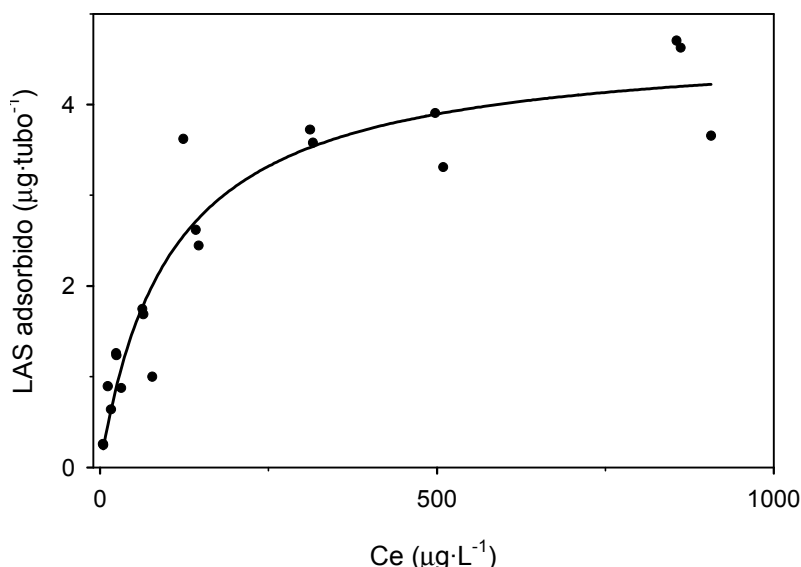
$$\frac{C_e}{C_s} = \frac{1}{k \cdot X_{\max}} + \frac{C_e}{X_{\max}}$$

donde  $C_e$  es la concentración de adsorbato en disolución ( $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ),  $C_s$  es la cantidad de adsorbato asociada al sedimento por unidad de adsorbente ( $\mu\text{g} \cdot \text{tubo}^{-1}$ ).  $k$  es una medida directa de la intensidad de la adsorción ( $\text{L} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ ), y  $X_{\max}$  es una constante relacionada con el área ocupada por la monocapa de adsorbato ( $\mu\text{g} \cdot \text{tubo}^{-1}$ ), que representa la capacidad máxima de la monocapa por unidad de adsorbente (Matthijs y De Henau, 1985).

La adsorción de C<sub>11</sub>LAS sobre el tubo de centrifuga (polipropileno) se ajusta bien a la isoterma de Langmuir (Fig. 4.3 y Tabla 4.8) en el intervalo de temperaturas estudiado. Estos resultados indican que la superficie del tubo es homogénea y que la energía de los distintos centros activos es similar. La adsorción se desarrolla en una

monocapa y el adsorbente presenta un máximo de adsorción (4.4-5.2 $\mu\text{g}$  de  $\text{C}_{11}\text{LAS}$  adsorbido en cada tubo) que corresponde a la capacidad máxima de la misma. En la figura 4.3 se observa que esta cantidad se alcanza cuando la concentración de equilibrio está en torno a unos 250  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  y permanece constante para concentraciones mayores.

La interacción entre la molécula de LAS y el polipropileno debe ser de tipo hidrófobo, entre la cadena alquílica del tensioactivo y la cadena hidrocarbonada del plástico. Una vez que la monocapa esté cubierta, los grupos polares del tensioactivo estarán orientados hacia la disolución y la formación de una bicapa no está favorecida. También se ha realizado un ajuste a una isoterma tipo Freundlich ( $C_s=K\cdot C_e^n$ , siendo  $K$  el coeficiente de adsorción y  $n$  una medida de la intensidad de adsorción), pero en todos los casos el valor del parámetro "n" fue inferior a la unidad ( $n\approx 0.45-0.60$ ). Este valor de 'n', según Matthijs y De Henau (1985), reafirma la idoneidad de la isoterma de Langmuir para explicar el proceso.



**Figura 4.3.** Cantidad de  $\text{C}_{11}\text{LAS}$  adsorbida ( $\mu\text{g}\cdot\text{tubo}^{-1}$ ) sobre las paredes del tubo de centrifuga (polipropileno) frente a la concentración de equilibrio. El ajuste aplicado corresponde a la isoterma de Langmuir.

La adsorción del  $\text{C}_{11}\text{SPC}$  sobre el tubo de centrifuga también ha sido estudiada a distintas temperaturas (5°, 15° y 25°C), utilizando las mismas concentraciones y siguiendo la misma metodología que para el LAS. En este caso la adsorción se ha detectado únicamente en los ensayos realizados a mayor concentración (1000  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), y el porcentaje adsorbido para el ácido sulfofenilcarboxílico ha sido inferior al 1%, mientras

que para el C<sub>11</sub>LAS este valor superó el 10% en todos los casos. Teniendo en cuenta la naturaleza polar del SPC, su pequeña afinidad por el plástico confirmaría la hipótesis de la interacción hidrófoba comentada anteriormente.

**Tabla 4.8. Parámetros de la isoterma de adsorción de Langmuir aplicada al C<sub>11</sub>LAS sobre el polipropileno de las paredes del tubo de centrifuga.**

Temperatura (°C)	X <sub>max</sub> (μg·tubo <sup>-1</sup> )	K (L·μg <sup>-1</sup> )	r <sup>2</sup>
5	5.23	6.42·10 <sup>-3</sup>	0.915
10	5.08	8.54·10 <sup>-3</sup>	0.989
15	4.40	7.24·10 <sup>-3</sup>	0.967
20	4.78	9.10·10 <sup>-3</sup>	0.971
25	4.66	12.23·10 <sup>-3</sup>	0.929

Estos resultados constatan la necesidad de caracterizar el proceso de adsorción sobre las paredes del recipiente donde se realizan los ensayos. En este sentido, Hand y Williams, (1987) y Westall *et al.*, (1999) recuperaron el <sup>14</sup>C-LAS adsorbido a las paredes del tubo mediante un cepillado, pero no caracterizaron este proceso, a pesar de que la fracción adsorbida sobre las paredes constituyó entre el 1 y el 10% del LAS total.

#### 4.3.3. Adsorción-desorción del p-undecilbenceno sulfonato (C<sub>11</sub>LAS) sobre sedimento marino

La adsorción total que se observa en los ensayos realizados es resultado de la suma de la adsorción sobre el polipropileno y sobre el sedimento. La caracterización del proceso de adsorción se ha realizado con la isoterma de Langmuir para la adsorción del LAS sobre el plástico y la de Freundlich para la adsorción del LAS sobre el sedimento. Para el conjunto de los datos la isoterma propuesta es de dos centros, que permite incluir en una misma expresión la adsorción sobre las dos superficies implicadas en el proceso, tal y como han aplicado previamente otros autores (González-Davila *et al.*, 1995). Así, los datos obtenidos en cada serie se han ajustado a una curva de este tipo:

$$X = \frac{a \cdot C}{b + C} + K' \cdot C^n$$

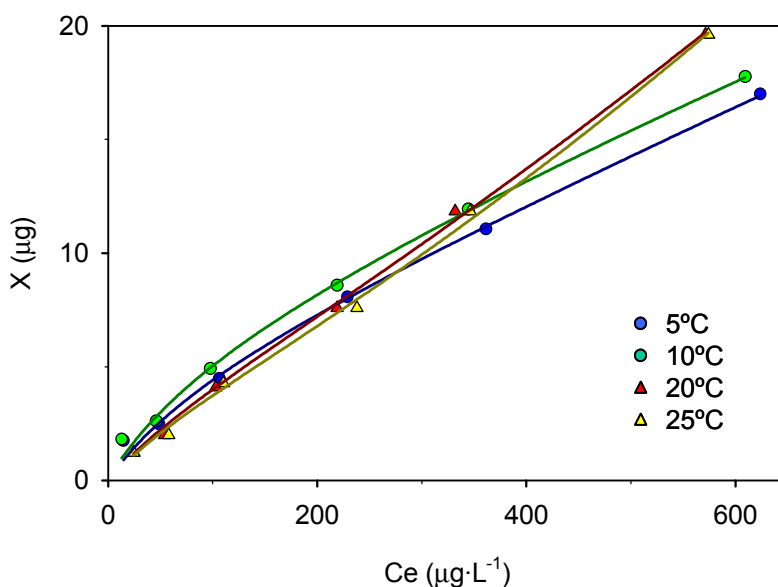
donde  $X$  es la masa total de analito adsorbido ( $\mu\text{g}$ ),  $C$  la masa disuelta del compuesto en el equilibrio ( $\mu\text{g}$ ) y,  $a$  y  $b$  son las constantes calculadas a partir de los ensayos de adsorción realizados sólo con el plástico,  $a$  es la capacidad máxima de la monocapa ( $X_{\text{max}}$ ) y  $b$  es la inversa de la constante de Langmuir ( $1/k$ ). En el segundo sumando,  $K'$  y  $n$  son parámetros de ajuste correspondientes a la adsorción sobre el sedimento, “ $n$ ” es una medida de la intensidad de adsorción. Puesto que la expresión de la isoterma se expresa como masa y no como concentraciones, la constante  $K$  de Freundlich se determina a partir de “ $K'$ ” dividiendo por la masa de sedimento presente en el ensayo (0.5g).  $K$  es una constante relacionada con la energía de enlace, que coincide con la constante de partición (compuesto adsorbido por unidad de concentración en equilibrio) cuando  $n=1$ .

La adsorción total del  $\text{C}_{11}\text{LAS}$  se ajusta bien a la isoterma de dos centros (Fig. 4.4) en el intervalo de concentraciones estudiado, y no presenta variaciones significativas con la temperatura (Bruce *et al.*, 1966). La variación de la cantidad adsorbida ( $\mu\text{g}$ ) con la concentración de equilibrio es lineal para valores de la concentración de equilibrio superiores a  $200 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . En esta zona se ha alcanzado la capacidad máxima de la monocapa para las paredes del tubo de centrifuga, y la masa adsorbida sobre el sedimento es proporcional a la concentración de equilibrio. Sin embargo para valores de la concentración de equilibrio inferiores a  $200 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  se observa una desviación de la linealidad como consecuencia de la simultaneidad del proceso de adsorción sobre las paredes del recipiente y de la adsorción sobre el sedimento. La isoterma de dos centros contempla ambas superficies de adsorción y explica la variabilidad de los resultados experimentales ( $r^2 > 0.995$  en todos los casos) en el intervalo de concentraciones utilizado y para las diferentes temperaturas (Tabla 4.9).

En general, no se aprecian grandes diferencias en la adsorción total del sistema con la temperatura, excepto para los casos de mayor concentración. Para dilucidar el origen de este aumento en la adsorción total en estas condiciones es necesario considerar el efecto de la temperatura sobre cada adsorbente. A pesar de la similitud en el proceso de adsorción a distintas temperaturas (Fig. 4.4), el parámetro  $K$  ( $K'/m$  siendo  $m$  la masa de sedimento), que caracteriza la adsorción sobre el sedimento, disminuye con la temperatura, probablemente como consecuencia del carácter exotérmico de la reacción de adsorción. Sin embargo se observa también un aumento simultáneo del parámetro  $n$ , relacionado con la intensidad de adsorción y que depende de la superficie de adsorción. Esta variación de  $n$  denota la existencia de la adsorción de LAS sobre dos superficies distintas, y un cambio en la afinidad del adsorbato por el sedimento o por el polipropileno

dependiendo de la temperatura. Los valores de  $n$  varían de forma inversa y de forma simultánea a los de  $K$ , y por tanto, estos últimos no son comparables entre sí.

Por ello para caracterizar el efecto de la temperatura se ha comparado la cantidad de LAS adsorbida al sedimento y al plástico ( $\mu\text{g C}_{11}\text{LAS}$ ) para las concentraciones de equilibrio a distintas temperaturas (Fig. 4.5). La cantidad de LAS adsorbida al plástico aumenta con la concentración de equilibrio hasta que alcanza un valor máximo ( $4\text{-}5\ \mu\text{g}$ ), correspondiente a la capacidad máxima de la monocapa y se mantiene constante. La adsorción sobre el sedimento aumenta ligeramente hasta un valor de la concentración de equilibrio entre  $200\text{-}250\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , a partir del cual aumenta notablemente con la concentración de adsorbato. Cuando se alcanza la capacidad máxima de la monocapa el proceso de adsorción se produce sobre el sedimento, sin embargo por debajo de este valor la molécula de LAS se adsorbe sobre ambas superficies. Como se muestra en la figura 4.5 este reparto está afectado por la temperatura, estando favorecida la adsorción sobre el plástico a mayor temperatura ( $20$  y  $25^\circ\text{C}$ ). Este hecho explicaría la variación de los valores de  $n$  con la temperatura observada en la tabla 4.9.



**Figura 4.4. Adsorción total de  $\text{C}_{11}\text{LAS}$  a distintas temperaturas con los ajustes obtenidos aplicando la isoterma de dos centros.**

**Tabla 4.9. Parámetros de la isoterma de adsorción de dos centros a las distintas temperaturas estudiadas. a y b son los parámetros determinados en los ensayos de adsorción sobre el plástico a cada temperatura y K y n son las constantes de Freundlich que corresponden a la adsorción sobre el sedimento. La representación de estas curvas se muestra en la figura 4.4.**

Temperatura (°C)	a	b	n	K	r <sup>2</sup>
5	5.23	155.87	0.9903	44.0	0.996
10	5.08	117.06	0.8927	69.6	0.996
15	4.40	138.12	1.1150	32.2	0.999
20	4.78	109.92	1.2786	9.4	0.998
25	4.66	81.76	1.3718	5.2	0.996

En la figura 4.6, se muestra la variación del 'coeficiente de partición' con la temperatura para las distintas concentraciones iniciales de LAS utilizadas, considerando que toda la adsorción (plástico+sedimento) se produce sobre el sedimento. Se observa una disminución significativa de este coeficiente con la temperatura para concentraciones inferiores a 400  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , a partir de la cual el valor disminuye ligeramente. También se observa una disminución del coeficiente de partición con la concentración para una misma temperatura, hecho que ha sido descrito previamente por Matthijs y De Henau (1985) también en sedimentos naturales. A bajas concentraciones de adsorbato, la adsorción se produce sobre los centros termodinámicamente más favorecidos de la superficie del adsorbente, y existe una menor competencia por ellos, por lo que la cantidad adsorbida puede ser proporcionalmente superior a la obtenida en otras condiciones.

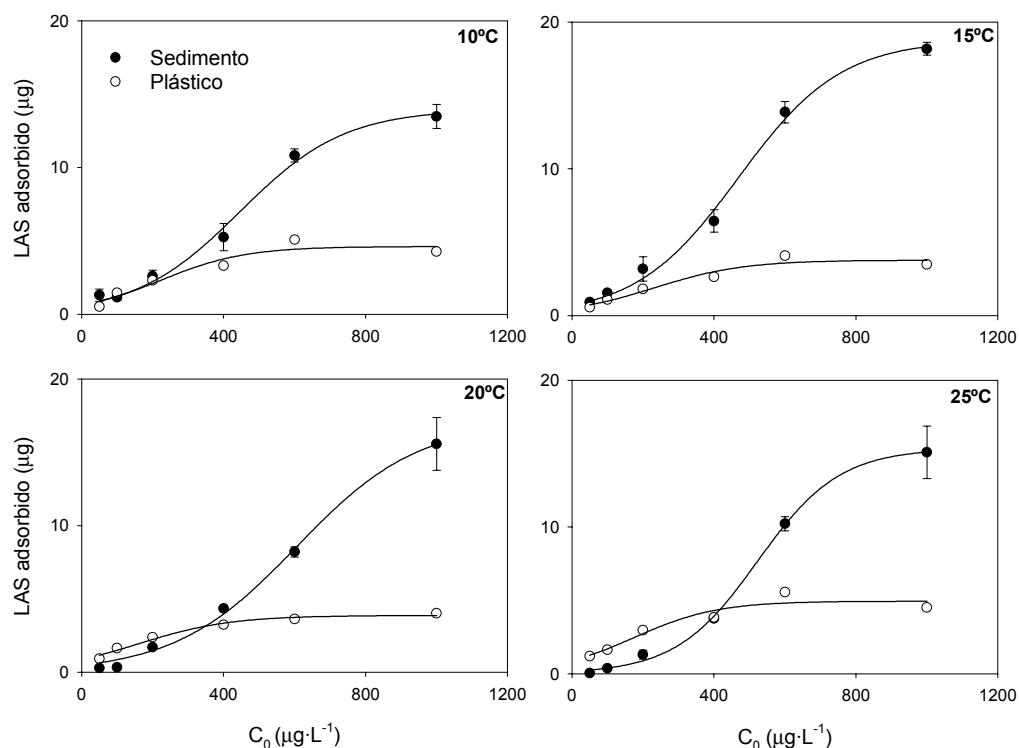


Figura 4.5. Distribución de la masa de  $C_{11}LAS$  adsorbida ( $\mu g$ ) al plástico y al sedimento frente a la concentración inicial de ensayo, en los ensayos realizados a 10, 15, 20 y 25°C.

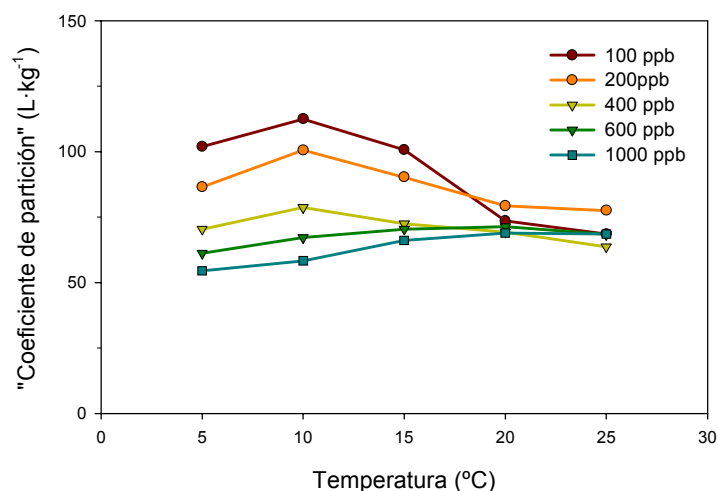


Figura 4.6. Variación del hipotético “coeficiente de partición” del  $C_{11}LAS$  con la temperatura, considerando que toda la adsorción (plástico+sedimento) se produce sobre el sedimento.



En la tabla 4.10 se muestra el porcentaje de C<sub>11</sub>LAS que se desorbe de los experimentos realizados a 5°C, así como los coeficientes de partición detectados tras los ensayos de adsorción y desorción. La desorción aumenta con la concentración de adsorbato, superando el 50% en los ensayos realizados a una concentración de LAS superior a 200 µg·L<sup>-1</sup>. Al aumentar la concentración de LAS no todas las moléculas son adsorbidas en centros activos, su interacción es más débil y son más “susceptibles” de desorberse.

**Tabla 4.10. Coeficientes de partición (K<sub>d</sub>) del C<sub>11</sub>LAS tras los ensayos de adsorción y desorción, y porcentaje de desorción a 5°C y distintas concentraciones iniciales.**

Concentración (µg·L <sup>-1</sup> )	K <sub>d</sub> adsorción (L·Kg <sup>-1</sup> )	K <sub>d</sub> desorción (L·Kg <sup>-1</sup> )	Desorción (%)
100	40.5 ± 5.1	103.9±17.1	9.4±3.2
200	40.8 ± 7.5	85.2±19.7	21.5±14.3
400	41.1 ± 4.8	67.2±33.8	49.2±19.3
600	55 ± 5.1	75.0±20.6	51.3±21.5
1000	41.0 ± 9.3	56.8±11.4	61.9±5.8

Los resultados muestran que la adsorción del LAS es un proceso reversible, tal y como anteriormente han recogido diferentes autores (Hand y Williams,1987; House y Farr, 1989; Westall *et al.*, 1999). La desorción del LAS del sedimento aumenta la fracción biodisponible de este compuesto, y consecuentemente la extensión de su biodegradación en el medio natural. Estos datos concuerdan con los de Matthijs y De Henau (1985), que detectaron tras tres ensayos consecutivos de desorción (1-15ppm C<sub>13</sub>LAS) que entre el 35 al 50% de este tensioactivo se desorbía, y constataron que parte del C<sub>13</sub>LAS permanecía adsorbido con un coeficiente medio de distribución de 93±34 L·Kg<sup>-1</sup>. El aumento del coeficiente de partición de desorción respecto al de adsorción, previamente descrito por Hand y Williams(1987) para el C<sub>14</sub>LAS, indica que el equilibrio está desplazado hacia el LAS adsorbido. Este aumento se debe a que la desorción de la fracción de LAS asociada a los centros preferentes de adsorción está menos favorecida, y requiere más tiempo para producirse, o bien porque para esta fracción, la desorción sea prácticamente irreversible, como Rubio *et al.*, (1996) indicaron previamente para sedimentos marinos. En este sentido Cornelissen *et al.*,(1997), describieron la desorción de compuestos orgánicos de suelos y sedimentos en dos etapas: una rápida seguida de

otra mucho más lenta. La desorción lenta estudiada para otros compuestos parece estar controlada por procesos de difusión lenta en los agregados de sedimento (Pignatello y Xing, 1996), siendo la materia orgánica su principal responsable (Cornelissen *et al.*, 1998). En estudios realizados con bifenilos policlorados y con hidrocarburos aromáticos policíclicos se ha constatado que este proceso depende de la difusión a través de los poros en la materia orgánica o de poros recubiertos por ella (Cornelissen *et al.*, 1998).

#### 4.3.4. Adsorción del ácido p-sulfofenil-undecanoico (C<sub>11</sub>-SPC) sobre sedimento marino

Al igual que se ha obtenido para el plástico, la adsorción del C<sub>11</sub>SPC sobre el sedimento es escasa o inexistente, sobre todo a bajas concentraciones. Los resultados no permiten ajustar a ninguna isoterma y son similares para diferentes temperaturas. Los coeficientes de partición obtenidos son inferiores a 10 L Kg<sup>-1</sup>.

El porcentaje de C<sub>11</sub>SPC adsorbido sobre el sedimento (Tabla 4.11) es siempre inferior al 10% del SPC total, y como se ha comentado anteriormente en el 60% de los casos no se ha detectado adsorción. El proceso de desorción del C<sub>11</sub>SPC es completamente reversible y rápido, ya que supera el 75% en todos los casos.

**Tabla 4.11. Porcentaje total adsorbido y de desorción para el C<sub>11</sub>SPC a distintas concentraciones iniciales.**

Concentración	Adsorción (%)	Desorción (%)
100	0.0	-
200	0.0	-
400	0.0	-
600	5.7±2.6	77.5±9.1
1000	9.7±3.8	88.1±4.4

#### 4.3.5. Valores de $\Delta H$ , $\Delta S$ y $\Delta G$ para la adsorción del C<sub>11</sub>LAS y el C<sub>11</sub>SPC

La estimación de los valores de las funciones termodinámicas para el C<sub>11</sub>LAS se ha realizado mediante el procedimiento propuesto por Biggar y Cheung (1973) que permite el cálculo de la constante de equilibrio termodinámica ( $K_0$ ) a dilución infinita en agua de mar. Estos parámetros se calculan a partir de la variación de la constante de equilibrio termodinámica ( $K_0$ ) con la temperatura. Esta constante se define para el proceso de adsorción como

$$K_0 = \frac{a_s}{a_e} = \frac{\gamma_s \cdot C_s}{\gamma_e \cdot C_e}$$

donde  $a_s$  y  $a_e$  son las actividades del soluto adsorbido(s) y del disuelto(e) respectivamente,  $C_s$  es la masa de soluto ( $\mu\text{g}$ ) adsorbida por mililitro de disolvente en contacto con la superficie de adsorción,  $C_e$  es la masa de soluto disuelto por mililitro de disolvente, y  $\gamma_s$  y  $\gamma_e$  son los coeficientes de actividad.  $C_s$  se calcula según la siguiente expresión (Fu *et al.*, 1948):

$$C_s = \frac{\frac{\rho_1 \cdot A_1}{M_1}}{\frac{s}{N \cdot (x/m)} - \frac{A_2}{M_2 \cdot 10^6}} \quad (1)$$

donde  $\rho_1$  es la densidad del disolvente ( $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ),  $M_1$  y  $M_2$  son los pesos moleculares respectivos ( $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) de la disolución y el soluto,  $A_1$  y  $A_2$  son las áreas específicas del disolvente y el soluto respectivamente,  $N$  es el número de Avogadro,  $s$  la superficie específica del adsorbente ( $\text{cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ ), y  $x/m$  la adsorción específica ( $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ). El área específica de adsorción (en  $\text{cm}^2$ ) de las moléculas de disolvente y de soluto se estiman según la ecuación propuesta por Koderá y Onishi (1959).

Como el LAS y el agua cumplen que:

$$\frac{s}{N \cdot (x/m)} \gg \frac{A_2}{M_2 \cdot 10^6}$$

la ecuación (1) puede reducirse a

$$C_s = \frac{\left( \frac{\rho_1 \cdot A_1}{M_1} \right)}{\frac{s}{N \cdot (x/m)}}$$

Cuando la concentración del soluto se aproxima a 0, el coeficiente de actividad se aproxima a la unidad, y entonces:

$$\lim_{C_e \rightarrow 0} \frac{C_s}{C_e} = \frac{a_s}{a_e} = K_o$$

Los valores de  $K_o$  se obtienen representando  $\ln (C_s/C_e)$  frente a  $C_e$ , y extrapolando a cero  $C_e$ . La energía libre estándar se calcula como  $\Delta G^\circ = -R \cdot T \cdot \ln K_o$ , la entalpía estándar a partir de la ecuación integrada de van't Hoff:

$$\ln K_o = \frac{-\Delta H^\circ}{R} \frac{1}{T}$$

y la entropía estándar a partir de:

$$\Delta S^\circ = \frac{(\Delta H^\circ - \Delta G^\circ)}{T}$$

En la figura 4.7 se muestra la representación del  $\ln (C_s/C_e)$  frente a  $C_e$  para las distintas temperaturas, ajustadas a una ecuación polinómica de tercer orden ( $y=y_0+a \cdot x+b \cdot x^2+c \cdot x^3$ ), de cuya extrapolación a cero se obtienen los valores de  $K_o$  ( $y_0=\ln K_o$ ). Los valores obtenidos para las distintas variables termodinámicas se muestran en la tabla 4.12. Se observa un descenso del coeficiente de partición del LAS (constante de equilibrio termodinámica a dilución infinita,  $K_o$ ) con la temperatura, tal y como se había obtenido previamente, y por tanto el proceso es exotérmico.

**Tabla 4.12. Valor estimado del coeficiente de partición para el C<sub>11</sub>-LAS a dilución infinita en agua de mar obtenido por ajuste a un polinomio de tercer grado. En la tabla se muestran también los incrementos de energía libre y entropía calculados a partir de este valor de  $K_o$ .**

Temperatura	$\ln K_o$	$r^2$	$\Delta G^\circ$ (KJ·mol <sup>-1</sup> )	$\Delta S^\circ$ (KJ·mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )
5°C	10.66	0.846	-24.43	-0.32
10°C	10.53	0.699	-24.94	-0.32
15°C	10.03	0.802	-23.93	-0.31
20°C	8.63	0.991	-20.88	-0.32
25°C	7.92	0.961	-18.31	-0.32

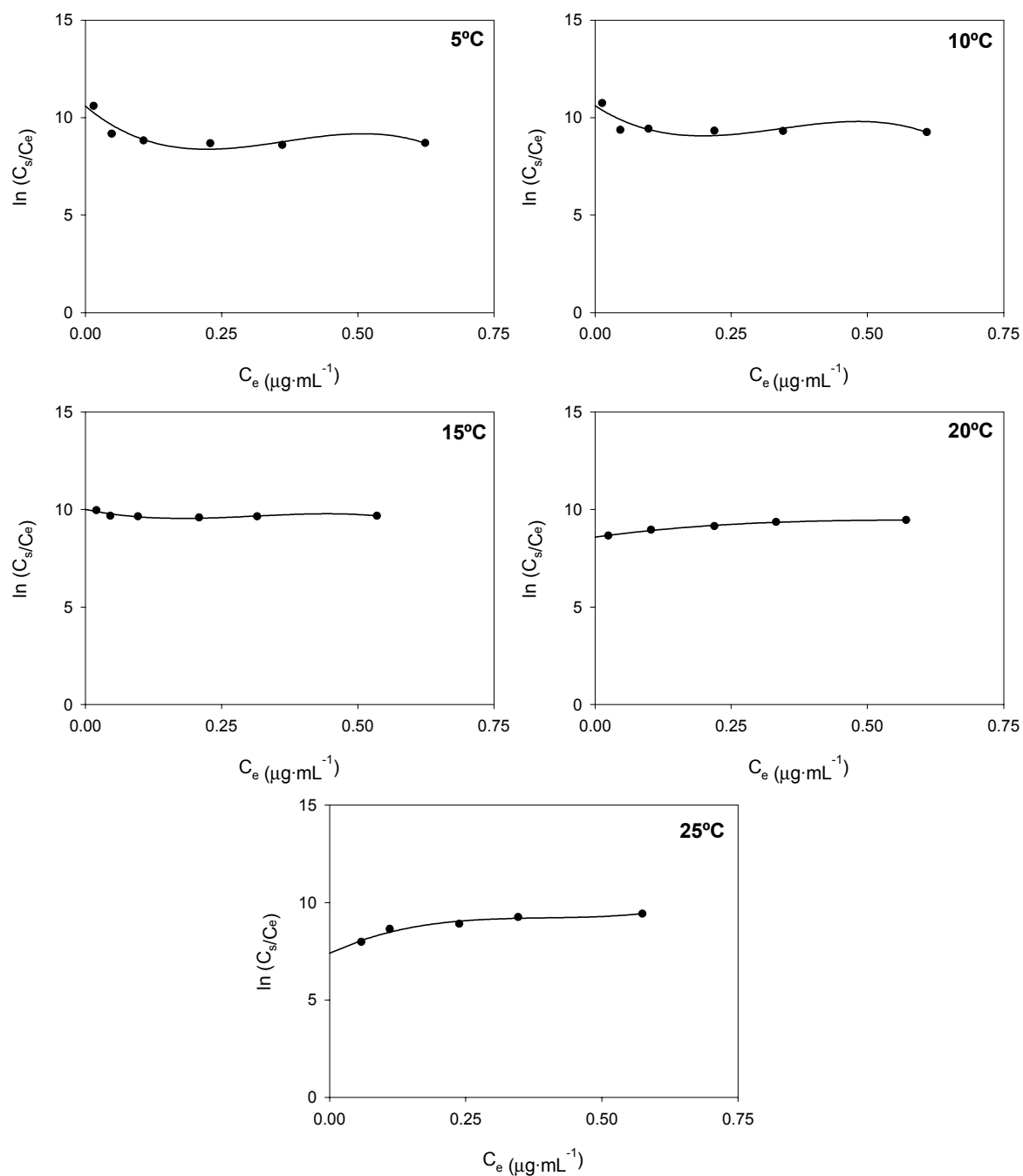


Figura 4.7. Representación para el cálculo de la constante de equilibrio a dilución infinita ( $K_0$ ) a cada temperatura, mostrando los ajustes a una ecuación polinómica de tercer utilizados.

El valor de la entalpía de adsorción calculada mediante el ajuste de  $\ln K_0$  frente a la inversa de la temperatura es de  $-114.65 \text{ KJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  ( $r^2 = 0.903$ ). Este valor caracteriza a un proceso de quimisorción, y por tanto a la unión adsorbato-adsorbente ( $\text{C}_{11}\text{LAS}$ -sedimento marino). Los calores diferenciales de quimisorción normalmente disminuyen cuando aumenta la cantidad adsorbida, y la energía de activación aumenta con el grado de recubrimiento ya que la superficie de adsorción presenta heterogeneidades. Esto implica la existencia de sitios más activos, siendo ocupados posteriormente los otros menos favorecidos, para lo cual será necesaria una energía de activación mayor, a la par que la energía de adsorción se hace menor. Así, en las condiciones en las que se ha desarrollado el ensayo (concentraciones ambientales de LAS y  $10\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de sólidos en suspensión), la adsorción se produce sobre la propia superficie del sedimento mediante interacciones específicas.

El proceso está favorecido termodinámicamente como indica el incremento de entropía durante la adsorción del LAS ( $-320 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\text{K}^{-1}$ ), y se produce de forma espontánea ( $\Delta G < 0$ ). En lo que respecta al  $\text{C}_{11}\text{SPC}$  no se ha detectado una tendencia clara con la temperatura por lo que no se han podido calcular los parámetros termodinámicos de su adsorción. La entalpía de adsorción se ha calculado de forma aproximada para la adsorción sobre el plástico aplicando la ecuación de Van't Hoff a los coeficientes de adsorción estimados a partir de la isoterma de Langmuir. La energía vinculada a la adsorción del LAS sobre el polipropileno es menor que para el sedimento, y sitúa el proceso en el límite entre la fisisorción y la quimisorción ( $\Delta H = -60 \text{ KJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ). Por último, la asociación del SPC con el sedimento debe ser mediante una débil fisisorción, teniendo en cuenta la baja adsorción presentada y la alta desorción.

#### **4.3.6. Adsorción de los homólogos de LAS y SPC ( $\text{C}_{10}$ - $\text{C}_{13}$ )**

La dependencia de la adsorción con la longitud de la cadena y con la presencia del grupo carboxílico en la cadena se ha evaluado comparando los homólogos  $\text{C}_{10}$ - $\text{C}_{13}$  del LAS y del SPC (Tabla 4.13). El porcentaje de LAS adsorbido sobre el polipropileno aumenta con la longitud de la cadena, siendo el mecanismo que gobierna la interacción LAS-plástico eminentemente hidrófobo. La adsorción total del sistema (sedimento+plástico) aumenta también con la longitud de cadena alquílica, y representa,

respecto al LAS total presente en el sistema, desde un 27% para el C<sub>10</sub>LAS hasta un 80% para el C<sub>13</sub>LAS.

En el caso de los SPC no se ha detectado adsorción sobre la superficie del plástico al haberse recuperado el 100% del analito en los blancos para todos los homólogos estudiados. Los homólogos de SPC utilizados en estos ensayos son los menos polares de la familia de los SPC monocarboxílicos, y por tanto, los que mayor adsorción deben presentar. De modo que puesto que no se ha detectado adsorción significativa sobre el plástico para estos homólogos, puede inferirse que en las condiciones ensayadas ninguno de los SPC monocarboxílicos se adsorbe sobre el polipropileno.

Los coeficientes de partición en el sedimento aumentan con la longitud de la cadena, tanto para los alquilbenceno lineal sulfonatos como para los ácidos sulfonilmonocarboxílicos (Tablas 4.13). Los valores obtenidos para el LAS son superiores ( $K_d=10\cdot 10^2 \text{ L}\cdot\text{Kg}^{-1}$ ) a los de los SPC ( $K_d<7 \text{ L}\cdot\text{Kg}^{-1}$ ). El coeficiente de partición de cada homólogo de LAS supera en más de un orden de magnitud al del SPC con el mismo número de átomos de carbono en la cadena hidrocarbonada. Debido a la clara preferencia del LAS por el plástico, el aumento del coeficiente de partición en sedimento es menor del esperado. Si consideramos que toda la adsorción detectada se produce sobre el sedimento (sedimento+plástico), obtendríamos unos hipotéticos coeficientes de partición, que se muestran en la tabla 4.13, más acordes con los registrados en la bibliografía (Tabla 4.3).

La desorción de los SPC es próxima al 100% en todos los casos estudiados, lo que corrobora la débil interacción que presentan estos compuestos con el sedimento, como se constató previamente para el C<sub>11</sub>SPC. La extensión de la desorción disminuye con la longitud de la cadena alquílica de los homólogos de LAS. Al igual que se obtuvo para el ensayo del C<sub>11</sub>LAS, los coeficientes de reparto para los homólogos del LAS han aumentado tras el ensayo de desorción, lo que indica de nuevo que el proceso de adsorción no es completamente reversible o que necesita un tiempo mayor para alcanzar el estado de equilibrio.

La distribución en el medio es claramente distinta para el LAS y los SPC, como era de esperar por sus diferencias estructurales. La presencia del grupo carboxílico en el extremo de la cadena (SPC) reduce la tendencia a acumularse en las interfases, al

aumentar su polaridad. Los coeficientes de partición en sedimento para los homólogos de LAS son 20 veces mayores que los de sus intermedios equivalentes, y los superan en más de 50 veces si se considera la adsorción total (sedimento+polipropileno).

**Tabla 4.13 Coeficientes de partición( $K_d$ ) de los homólogos de LAS y SPC (C10-C13), obtenidos para sedimento marino y el sistema completo de adsorción (sedimento+plástico) a 15°C y 400  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ .**

Homólogo	Coeficiente de partición ( $\text{L}\cdot\text{Kg}^{-1}$ )	
	$K_d$ sedimento	$K_d$ sedimento+plástico
C10-SPC	$1 \pm 1$	$1 \pm 1$
C11-SPC	$3 \pm 2$	$3 \pm 2$
C12-SPC	$4 \pm 6$	$4 \pm 6$
C13-SPC	$7 \pm 4$	$7 \pm 4$
C10-LAS	$12 \pm 5$	$40 \pm 11$
C11-LAS	$62 \pm 7$	$118 \pm 9$
C12-LAS	$116 \pm 13$	$218 \pm 20$
C13-LAS	$137 \pm 38$	$469 \pm 77$

A modo de resumen podemos concluir que el mecanismo de adsorción del LAS en sedimentos marinos es de tipo hidrófobo. Para los SPC aunque se han observado diferencias de significativas de unos homólogos a otros, el tipo de interacción no puede ser caracterizado. La reversibilidad de la adsorción del LAS en el medio marino, indica que la fracción adsorbida puede estar también biodisponible, si se dan las condiciones apropiadas (reducción de la concentración de LAS en la disolución con la que está en contacto).



#### 4.4. BIBLIOGRAFÍA

- Amano, K., Fukushima, T., Inaba, K., Nakasugi, O. 1989. Sorption of linear alkylbenzenesulfonates with the suspended solids in natural aquatic systems. *Jpn. J. Water Pollut. Res.*, 12:505-515.
- Amano, K., Fukushima, T. 1993. Paritioning of linear alkylbenzenesulfonates in natural water and sediment. *J. Environ. Sci. Health*, 28, 3:683-696.
- Berna, J. L., Ferrer, J., Moreno, A., Prats, D., Ruiz Bevia, F. 1989. The fate of LAS in the environment. *Tenside Surfact. Det.*, 26, 2:101-107.
- Beveridge, A., Pickering, W. F. 1983. The influence of surfactants on the adsorption of heavy metal ions by clays. *Wat. Res.*, 17:215-225.
- Biggar, J.W.; Cheng, M.W. 1973. Adsorption of picloram (4-amino-3,5,6-trichloropicolinic acid) on panoche, ephrata, and palouse soils: a thermodynamic approach to the adsorption mechanism. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 37: 863-868.
- Brownawell, B.J., Chen, H.; Zhang, W.; Westall, J.C. 1991. Adsorption of surfactants. En Organic substances and sediments in water: processes and analytical, editor Baker, R.A., Lewis Publishers: Chelsea, MI, 127-147.
- Bruce, A.M., Swanwick, J.D., Owsorth, R.A. 1966. Synthetic detergents and sludge digestion: some recent observations. *J.Proc. Inst. Sew. Purif. (Part. 5.)*: 427-447.
- Cano, M.L., Dorn, P.B. 1996. Sorption of an alcohol ethoxylate surfactant to natural sediments. *Environ. Toxicol. Chem.*, 15,5:684-690.
- Chandar, P., Somasundaran, P., Turro, N.J. 1987. Fluorescence probe studies on the structure of the adsorbed layer of dodecyl sulfate at the alumine water interface. *J.Colloid Interf. Sci.*, 117: 31-46.
- Cohen, L., Moreno, A., Berna, L. 1993. Influence of calcium concentration in the washing liquor on detergency performance of linear alkylbenzene sulfonate. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 70, 1:79-82.
- Cornelissen, G., van Noort, P. C. M., Govers, H. A. J. 1998. Mechanism of slow desorption of organic compounds from sediments: a study using model sorbents. *Environ. Sci. Technol.*, 32, 20:3124-3131.
- Dao, K., Bee, A., Treiner, C. 1998. Adsorption isotherm of sodium octylbenzenesulfonate on iron oxide particles in aqueous solutions. *J. Colloid Interf. Sci.*, 204: 61-65.
- Di Toro, D. M., Dodge, L. J., Hand, V. C. 1990. A model for anionic surfactant sorption. *Environ. Sci. Technol.*, 24, 1013-1020.
- Fernández, N. A., Chacín, E., Gutierrez, E., Alastre, N., Llamaza, B., Foster, C. F. 1995. Adsorption of lauryl benzyl sulphonate on algae. *Biores. Technol.*, 54, 111-115.

- Ferrer, J., Moreno, A., Vaquero, M. T., Comellas, L. 1997. Monitoring of LAS in direct discharge situations. *Tenside Surfact. Det.*, 34, 4:278-282.
- Fu, Y., Hansen, R.S., Bartell, F.F. 1948. Thermodynamics of adsorption from solutions: I. The mobility and activity coefficients of adsorbed layers. *J. Phys. Chem.*, 52: 374-386.
- Fytianos, K., Voudrias, E., Mouratidou, T. 1998a. The sorption-desorption behaviour of linear alkylbenzene sulfonate in marine sediments. *Chemosphere*, 36, 9, 2067-2074.
- Fytianos, K., Voudrias, E., Papamichali, A. 1998b. Behaviour and fate of linear alkylbenzene sulfonate in different soils. *Chemosphere*, 36, 13, 2741-2746.
- Games, L.M. 1982. Field validation of exposure analysis modelling system (EXAMS) in a flowing stream. Capítulo 18 en 'Modelling the fate of chemicals in the aquatic environment'. 4<sup>th</sup> Meeting 1981. De. Dickson K.L., Maki, A.W. & Cairns. J. Ann. Arbor. Sci. Ann Arbor Michigan, USA, 325-346.
- Giger, W., Alder, A. C., Brunner, P. H., Marcomini, A., Siegrist, H. 1989. Behaviour of LAS in sewage and sludge treatment and in sludge-treated soil. *Tenside Surfact. Det.*, 26, 2:95-100.
- González-Davila, M., Santana-Casiano, J.M., Pérez-Peña, J. 1995. Binding of Cu(II) to the surface and exudates of the alga *Dunaliella tertiolecta* in seawater. *Environ. Sci. Technol.*, 29,2:289-301.
- González-Mazo, E., Quiroga, J. M., Sales, D., Gómez-Parra, A. 1997b. Levels of linear alkylbenzenesulfonate (LAS) in waters and sediments of the coastal ecosystems of the Gulf of Cadiz. *Toxicol. Environ. Chem.*, 59, 77-87.
- González-Mazo, E., Forja, J. M., Gómez-Parra, A. 1998. Fate and distribution of linear alkylbenzene sulfonates in the littoral environment. *Environ. Sci. Technol.*, 32, 11:1636-1641.
- Hand, V. C., Williams, G. K. 1987. Structure-activity relationships for sorption of linear alkylbenzenesulfonates. *Environ. Sci. Technol.*, 21, 4:370-373.
- Hand, V. C., Rapaport, R. A., Pittinger, C. A. 1990. First validation of a model for the adsorption of LAS to sediment and comparison to chronic effects data. *Chemosphere*, 21, 6:741-750.
- House, W.A., Farr, I.S. 1989. Adsorption of sulphonates from detergent mixtures on potassium kaolinite. *Colloids and Surface*, 40: 167-180.
- Inoue, K., Kaneko, K.; Yoshida, M. 1978. Adsorption of dodecylbenzenesulfonates by soil colloids and influence of soil colloids on their degradation. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 24,91-102.
- Karickhoff, S.W., Brown, D.S., Scott, T.A. 1979. Sorption of hydrofobic pollutants on natural sediments. *Wat. Res.*, 13,3: 241-248.
- Kodera, K., Onishi, Y. 1959. The molecular cross-sectional areas for the determination of specific surface area of solids: I. Carbon blank. *Chem Soc. Jap. Bull.* 32: 356-361.

- Li, B., Ruckenstein, E. 1996. Adsorption of ionic surfactants on charged solid surfaces from aqueous solutions. *Langmuir*, 12, 21:5052-5063.
- Marchesi, J.R.; Doeting, H.W., Thiele, M., Blume, H. 1991. A comparative study o the adsorption of linear alkyl sulphates and alkylbenzene sulphonates on river sediments, *Colloids and Surfaces*, 53, 163-178.
- Marcomini, A., Giger, W. 1988. Behaviour of LAS in sewage treatment. *Tenside Surfact. Det.*, 25, 4:226-229.
- Mattheson, K.L., Cox, M.F., Smith, D.L. 1985. Detergency performance comparison between LAS and ABS using calcium sulfonate precipitation boundary diagrams. *J.Am. Oil Chem. Soc*, 62,1391-1396.
- Matthijs, E., De Henau, H. 1985. Adsorption and desorption of LAS. *Tenside Det.*, 22, 6:299-342.
- McAvoy, D. C., White, C. E., Moore, B. L., Rapaport, R. A. 1994. Chemical fate and transport in a domestic septic system: sorption and transport of anionic and cationic surfactants. *Environ. Toxicol. Chem.*, 13, 2:213-221.
- Ou, Z., Yediler, A., He, Y.W., Kettrup, A., Sun, T. 1995. Effects of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) on the adsorption behaviour of phenathrene on soils. *Chemosphere*, 30, 2: 313-325.
- Ou, Z., Yediler, A., Jia, L., Kettrup, A., Sun, T. 1996. Adsorption of linear alkylbenzene sulfonate(LAS) on soils. *Chemosphere*, 32, 5:827-839.
- Park, J.W., Jaffe, P.R. 1993. Partitioning of three nonionic organic compounds between adsorbed surfactants, micelles and water. *Environ. Sci. Technol.*, 27, 2559-2565.
- Pignatello, J.J., Xing, B. 1996. Mechanisms of slow sorption of organic chemicals to natural particles. *Environ. Sci. Technol.*, 30, 1-11.
- Prats, D., Ruiz, F., Vázquez, B., Zarzo, D., Berna, J. L., Moreno, A. 1993. LAS homolog distribution shift during wastewater treatment and composting: ecological implications. *Environ. Toxicol. Chem.*, 12, 1599-1608.
- Rubio, J. A., González-Mazo, E., Gómez-Parra, A. 1996. Sorption of LAS on marine sediment. *Mar. Chem.*, 54, 171-177.
- Santana-Casiano, J.M., González-Davila, M., Pérez-Peña, J., Millero, F.J. 1995. Pb<sup>2+</sup> interactions with the marine phytoplankton *Dunaliella tertiolecta*, *Mar. Chem.*, 48, 2:115-129.
- Scheunert, I., Korte, F. 1985. Interactions in the fate of chemicals in terrestrial systems. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 6:385-391.
- Seth, R., Machay, D., Munke, J. 1999. Estimating the organic carbon partition coefficient and its variability for hydrophobic chemicals. *Environ. Sci. Technol.*, 33, 14:2390-2394.

- Somasundaran, P., Huang, L. 1997. Adsorption behaviour of surfactant mixtures at solid-liquid interface. *Polish J. Chem.*, 71, 568-582.
- Stum, W. 1992. Adsorption. En: Chemistry of the solid-water interface. 1988. Processes at the mineral-water and particle-water interface in natural systems. Wiley-Interscience, New York. 87-156.
- Talens, F. I., Patón, P., Gaya, S. 1998. Micelar flocculation of anionic surfactants. *Langmuir*, 14, 5046-5050.
- Tabor, C. F., Barber, L. B. 1996. Fate of linear alkylbenzene sulfonate in the Mississippi River. *Environ. Sci. Technol.*, 30, 1:161-171.
- Terzic, S., Ahel, M. 1994. Input and behaviour of linear alkylbenzenesulphonates (LAS) in a stratified estuary. *Mar. Poll. Bull.*, 28, 12:735-740.
- Traina, S. J., McAvoy, D. C., Versteeg, D. J. 1996. Association of LAS with dissolved humic substances and its effect on bioavailability. *Environ. Sci. Technol.*, 30, 4:1300-1309.
- Urano, K., Saito, M., Murata, C. 1984. Adsorption of surfactants on sediments, *Chemosphere*, 13,293-300.
- Verge, C., Moreno, A., Bravo, J., Berna, J.L. 2001. Influence of water hardness on the bioavailability and toxicity of linear alkylbenzene (LAS). *Chemosphere* (en prensa)
- Waters, J., Holt, M. S., Matthijs, E. 1989. Fate of LAS in sludge amended soils. *Tenside Surfact. Det.*, 26, 2:129-135.
- West, C.C., Harwell, J.H. 1992. Surfactants and subsurface remediation. *Environ. Sci. Technol.*, 26, 2324-2330.
- Westall, J.C. 1987. Adsorption mechanisms in aquatic surface chemistry. En: Werner Stumm Editions, Aquatic Surface Chemistry, John Wiley and Sons/Wiley-Interscience, New York, pp. 3-32.
- Westall, J. C., Chen, H., Zhang, W., Brownawell, B. J. 1999. Sorption of linear alkylbenzenesulfonates on sediment materials. *Environ. Sci. Technol.*, 33, 18:3110-3118.

**5. NIVELES DE ALQUILBENCENO LINEAL SULFONATOS  
Y ÁCIDOS SULFOFENILCARBOXÍlicos EN SISTEMAS  
LITORALES DE LA PENÍNSULA IBÉRICA**

## 5.1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Los sistemas litorales constituyen espacios altamente afectados por la actividad humana, como consecuencia del elevado porcentaje de población que reside en zonas costeras (37% de la población mundial, Cohen *et al.*, 1997). Por ello, los sistemas litorales reciben grandes cantidades de tensioactivos, procedentes de las aguas residuales urbanas, tratadas o no, y del aporte a través de los ríos (figura 5.1). Existen también otros aportes indirectos procedentes de escorrentías superficiales, aguas subterráneas, etc., pero de menor importancia.

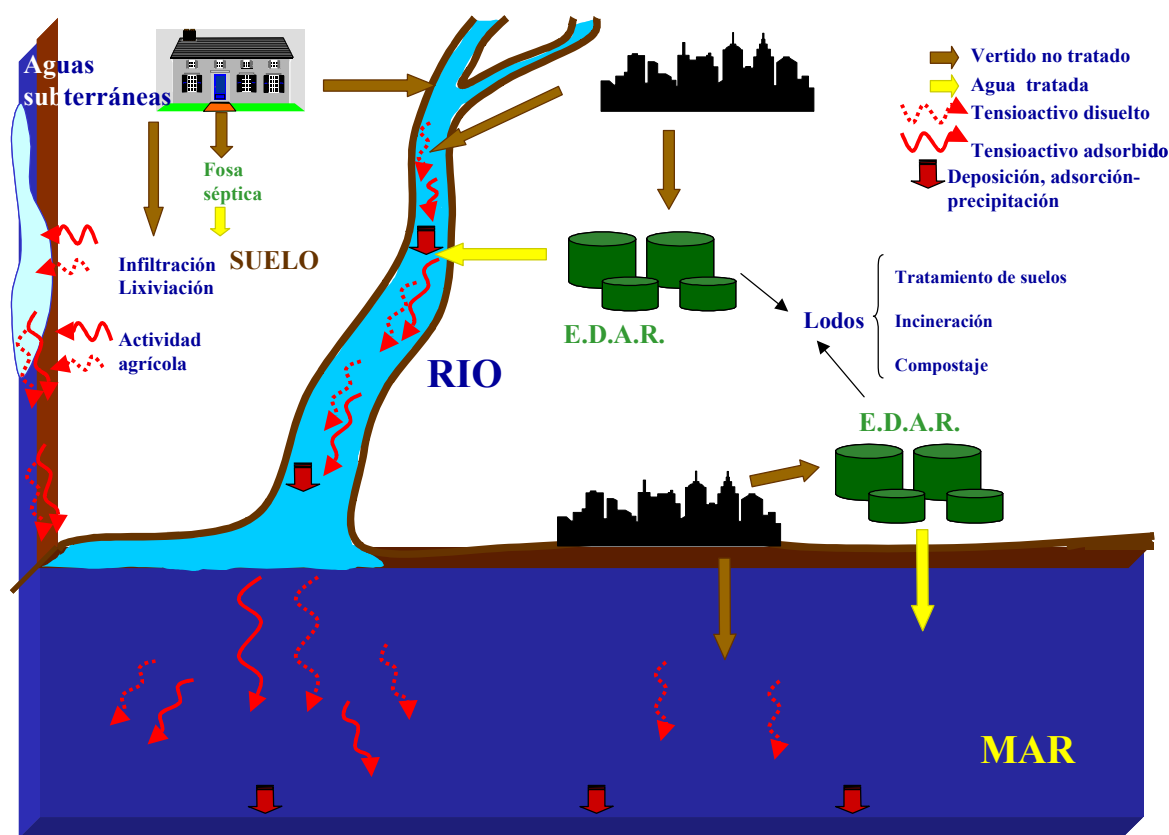


Figura 5.1. Posibles rutas de acceso del LAS a los sistemas litorales, tanto estuáricos como marinos .

El LAS es inicialmente degradado (12-60%) en las conducciones de alcantarillado (Berna *et al.*, 1989; Moreno *et al.*, 1990; Sánchez-Leal *et al.*, 1994), como lo confirma la detección de intermedios de degradación en el agua residual (Romano y Ranzani, 1992; Cavalli *et al.*, 1993). Sin embargo los ácidos sulfonilcarboxílicos no se han detectado en otros casos (Holt *et al.*, 1995), probablemente como consecuencia de la menor longitud

de las canalizaciones. La concentración de alquilbenceno lineal sulfonato (LAS) en el influente de plantas de tratamiento de aguas residuales de Europa y Norteamérica varía entre 0.5 y 24.5 mg·L<sup>-1</sup>, con valores medios entre 2 y 5 mg·L<sup>-1</sup> (Painter y Zabel, 1989; Rapaport y Eckhoff, 1990; Holt *et al.*, 1998; McAvoy *et al.*, 1998), muy superiores a los detectados en los efluentes (4-1500 µg·L<sup>-1</sup>) (Holt *et al.*, 1995; McAvoy *et al.*, 1998; Holt *et al.*, 1998). En los países desarrollados gran parte del agua residual se suele depurar en plantas de tratamiento terciario, en donde se elimina más del 95% del LAS. El porcentaje eliminado depende del tipo de tratamiento (tabla 5.1), y llega hasta el 98% en plantas que incluyen un tratamiento de lodos activos.

El LAS es eliminado de la fase acuosa en una planta de tratamiento a través de biodegradación (65-92% del total) y por procesos quimicofísicos (precipitación, adsorción,...) (Berna *et al.*, 1989). Estos procesos ocurren en mayor extensión para los homólogos de mayor peso molecular y los isómeros externos. Como resultado, el agua depurada contiene un mayor porcentaje de los homólogos e isómeros más solubles (Prats *et al.*, 1993; Field *et al.*, 1994), y el LAS está asociado en su mayor parte al material en suspensión, constituyendo esta fracción hasta el 50% del total (Berna *et al.*, 1989; Sánchez *et al.*, 1994). En este sentido, los procesos de precipitación y adsorción alcanzan especial importancia, sobre todo, al aumentar la dureza del agua (Cohen *et al.*, 1993), encontrándose concentraciones de LAS en lodos de entre 1 g·Kg<sup>-1</sup> y 10 g·Kg<sup>-1</sup> de LAS (Berna *et al.*, 1989; Romano y Ranzani, 1992).

Aunque las concentraciones encontradas para los SPC en el influente (7-1000 µg·L<sup>-1</sup>) y el efluente (50 y 1500 µg·L<sup>-1</sup>) son similares (Field *et al.*, 1992; Cavalli *et al.*, 1993; Di Corcia *et al.*, 1999), la proporción de los homólogos varió a lo largo del tratamiento, ya que se observó una longitud de cadena alquílica carboxilada media de 9 átomos de carbono en el influente, y de 6 átomos de carbono en el efluente (Cavalli *et al.*, 1993; Field *et al.*, 1992).

El agua tratada presenta una baja carga contaminante, y es descargada en el compartimento acuático (río, lago o mar) o reutilizada para riego. Los lodos, una vez tratados aeróbica (100-500 mg·Kg<sup>-1</sup> LAS) o anaeróbicamente (1330-30200 mg·Kg<sup>-1</sup> LAS), se utilizan como fertilizante en suelos (Solbé *et al.*, 2000), donde se elimina más del 90% del LAS restante (tiempos de vida medios 5-117 días, Scott y Jones, 2000).

**Tabla 5.1. Eliminación del LAS en la fase acuosa del agua residual en plantas de tratamiento con lecho bacteriano y lodos activos de distintos países.**

Tipo de Planta	País	LAS total eliminado (%)	Referencia
Con lecho bacteriano	Alemania	91	Matthijs y De Henau, 1987
	EEUU	77.4±15.5	McAvoy <i>et al.</i> , 1993
	EEUU	82	McAvoy <i>et al.</i> , 1998
Con lodos activos	----- España	98-99	Berna <i>et al.</i> , 1989
	España	98.5	Sánchez <i>et al.</i> , 1994
	España	99.4	Prats <i>et al.</i> , 1997
	Alemania	98	Matthijs y De Henau, 1987
	Alemania	99.7	Schröder <i>et al.</i> , 1999
	Italia	98-99	Romano y Ranzani, 1992
	Italia	98.6	Di Corcia <i>et al.</i> , 1999
	Reino Unido	98-99.9	Holt <i>et al.</i> , 1995
	Suiza	99.5	Giger <i>et al.</i> , 1987
	Europa	98.5-99.9	Feijtel <i>et al.</i> , 1996
	EEUU	99	McAvoy <i>et al.</i> , 1998

A pesar de que la normativa española (Real Decreto-Ley 11/1995, de 28 de diciembre, como trasposición al ordenamiento interno de la Directiva 91/271/CEE) obliga a someter a las aguas residuales urbanas procedentes de aglomeraciones superiores a 15000 habitantes a un tratamiento secundario antes del 1 de enero del 2001. En España es todavía práctica común el vertido de las aguas residuales sin tratar en ríos (Ferrer *et al.*, 1997) o zonas costeras (González-Mazo *et al.*, 1998).

#### 5.1.1. Comportamiento del LAS en el medio

Aunque existen numerosos datos de niveles de LAS en ríos y estuarios, su comportamiento ambiental, en términos de los mecanismos involucrados en su transporte y reactividad, ha recibido menor atención. Los estudios en aguas subterráneas y en el medio marino son escasos y se han realizado básicamente en la última década (e.g.: Field *et al.*, 1992; Takada *et al.*, 1992a; Matthijs y Stalmans, 1993; González-Mazo *et al.*, 1997; 1998), coincidiendo con el desarrollo de nuevas técnicas de



concentración/separación y análisis del LAS que permiten determinar concentraciones a niveles de ppb o inferiores. Los datos de concentraciones de SPC son escasos, y su comportamiento es, hasta la fecha, desconocido.

Las concentraciones de LAS dependen de la existencia o no de plantas de tratamiento de aguas residuales y de la distancia al punto de vertido. A su vez, la influencia de los principales procesos implicados en la retirada de LAS del medio (biodegradación, dilución, precipitación, adsorción), viene determinada por las características del sistema donde se produce el vertido (río, estuario, lago o mar).

### **A. Ríos**

Las concentraciones de LAS encontradas en agua y sedimentos fluviales presentan una gran variabilidad, como consecuencia de las distintas características de cada zona de estudio. Los valores encontrados en agua ( $0-623 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) (Takada e Ishiwatari, 1987; McAvoy *et al.*, 1993; Tabor y Barber, 1996; Schöberl, 1997) y en sedimento ( $0-567 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) (Takada e Ishiwatari, 1987; Schöberl y Spilker, 1996; Tabor y Barber, 1996; Cavalli *et al.*, 2000), muestran una clara afinidad del compuesto por la fase sólida. Los coeficientes de partición del LAS en sedimentos fluviales oscilan entre 100 y  $2600 \text{ L}\cdot\text{Kg}^{-1}$  (Tabor y Barber, 1996).

Las máximas concentraciones se han detectado cerca de los núcleos urbanos, observándose un rápido descenso río abajo (Tabor y Barber, 1996; Ding *et al.*, 1999). Algunos autores han encontrado que la dilución es el principal responsable del descenso de la concentración de LAS a lo largo del río (Tabor y Barber, 1996; Ferrer *et al.*, 1997; Ding *et al.*, 1999), otros sin embargo, consideran a la biodegradación el proceso más eficaz (Takada *et al.*, 1994; Tabor y Barber, 1996).

La detección de ácidos sulfonilcarboxílicos de cadena corta (Field *et al.*, 1992, Tabor y Barber, 1996; Di Corcia *et al.*, 1999; Ding *et al.*, 1999; Marcomini *et al.*, 2000) ha demostrado la biodegradación en el medio natural. En general las concentraciones detectadas son pequeñas, un orden de magnitud inferiores a las de LAS (Field *et al.*, 1992, Tabor y Barber, 1996; Ding *et al.*, 1999), excepto para el río Osellino (Marcomini *et al.*, 2000) donde la concentración total de SPC superó a la de LAS. Las concentraciones más elevadas de los intermedios de degradación se observan también en las zonas

cercanas a los efluentes de aguas residuales (Tabor y Barber, 1996; Marcomini *et al.*, 2000). Los SPC y las dialquiltetralinas (DATS) también han sido detectados en algunas muestras de sedimentos fluviales (Tabor y Barber, 1996).

**Tabla 5.2. Niveles de LAS en agua, sólidos en suspensión (S.S.) y sedimento de diferentes ríos.**

Fase	Río	[LAS]	Referencia
Agua ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	Guadalquivir	0.19	Moreno-Danvila, 1987
	Llobregat	3-137	Ferrer <i>et al.</i> , 1997
	varios alemanes	0.9-623	Schöberl, 1997
	varios de EEUU	<10-330	McAvoy <i>et al.</i> , 1993
	Mississippi	0-10.3	Tabor y Barber, 1996
	Tamagawa	17-484	Takada e Ishiwatari, 1987
	Lao-Jie	12-135	Ding <i>et al.</i> , 1999
S.S. ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	Llobregat	0.3-1.4	Ferrer <i>et al.</i> , 1997
	Varios alemanes	2-73	Schöberl <i>et al.</i> , 1996
Sedimento ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	Lippe	0-3.3	Schöberl y Spilker, 1996
	Varios alemanes	2-209	Schöberl, 1997
	Po	0.3-4.7	Cavalli <i>et al.</i> , 2000
	Mississippi	0.01-20	Tabor y Barber, 1996
	Varios EEUU	59.7-182.1	McAvoy <i>et al.</i> , 1993
	Tamagawa	0.6-500	Takada e Ishiwatari, 1991
	Sumidagawa	0.1-36.6	Takada <i>et al.</i> , 1992b

La proporción de LAS adsorbido sobre los sólidos en suspensión es variable, pudiendo constituir entre el 3% y el 5% del total (Takada *et al.*, 1994; Schöberl *et al.*, 1996). La sedimentación se produce principalmente cerca del vertido, y por ello, es también allí donde se detectan las mayores concentraciones de LAS en sedimento (Takada *et al.*, 1992a; Trehy *et al.*, 1990; Tabor y Barber, 1996), y el resto es transportado a zonas alejadas antes de su deposición (Tabor y Barber, 1996). En todos los casos, la proporción de homólogos de cadena larga es mayor en la fase sólida (sólidos en suspensión y sedimento) que en agua y por supuesto, que en el LAS comercial (Tabor y Barber, 1996; Cavalli *et al.*, 2000).

La distribución vertical del LAS en la columna sedimentaria se ha caracterizado en

varios lagos (Amano *et al.*, 1989; Reiser *et al.*, 1997), evidenciando su degradación en los primeros 5 cm, pero no a profundidades mayores, donde las condiciones deben ser anóxicas. Amano *et al.*, (1991, 1992) han estudiado la variación temporal de la concentración de LAS en sedimentos superficiales, y han estimado el flujo en la interfase agua-sedimento. Según el modelo propuesto por estos autores durante el verano el 85% del LAS que accede al estuario se biodegrada, y el 9% sedimenta, mientras que en invierno la degradación constituye sólo el 11%, la sedimentación el 12%, y más del 75% continúa en la corriente del río.

### **B. LAS en sistemas estuáricos y marinos**

El LAS presenta un comportamiento no conservativo tanto en estuarios (Takada y Ogura, 1992; Stalmans *et al.*, 1991; Matthijs y Stalmans, 1993; Marcomini *et al.*, 2000) como en el medio marino (González-Mazo *et al.*, 1998). En estos sistemas, por tanto, desciende la concentración de LAS de manera más acusada de lo que cabría esperar debido a un proceso de dilución. En este sentido, Takada y Ogura (1992) calificaron a los estuarios como barreras eficientes a la entrada de LAS al medio marino. Los procesos de adsorción y precipitación son más intensos que en el medio continental, y la biodegradación es más lenta, y menos extensa que en agua dulce (Terzic *et al.*, 1992). La adsorción sobre el material particulado está favorecida con el aumento de la fuerza iónica (Amano *et al.*, 1992; González-Mazo *et al.*, 1996), la precipitación aumenta con la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $10^{-2}\text{M}$  en agua de mar, Cohen *et al.*, 1993) y los microorganismos del medio marino son menos activos en la biodegradación que los de agua dulce (Larson *et al.*, 1993).

Las concentraciones de LAS presentan una elevada variabilidad (tabla 5.3) como consecuencia de los distintos procesos que favorecen su eliminación a lo largo del estuario. Takada y Ogura (1992) caracterizaron la distribución de LAS en agua, sólidos en suspensión y sedimentos a lo largo del estuario del Tamagawa (Japón). Las concentraciones disminuyen hacia el mar en las tres fases, especialmente durante los meses de verano, en los que se degrada todo el LAS que accede al estuario.

**Tabla 5.3. Niveles de LAS en agua ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), sólidos en suspensión ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) y sedimento ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) en diferentes sistemas estuáricos.**

Fase	Estuario	[LAS]	Referencia
Agua ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	Barbate	6.1 – 9.8	González-Mazo <i>et al.</i> , 1997
	Scheldt	<0.5 – 9.4	Matthijs y Stalmans, 1993
	Laguna Venecia	1.3-256	Marcomini <i>et al.</i> , 2000
	Krka	0.9-391	Terzic y Ahel, 1994
	Tamagawa	8.1-444	Takada y Ogura, 1992
S.S. ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	Tamagawa	3-704	Takada y Ogura, 1992
	Varios japoneses	4.82±7.36	Takada e Ishiwatari, 1991
Sedimento ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	Tamagawa	0.5-24	Takada y Ogura, 1992
	Tamagawa	0.12-45.1	Takada <i>et al.</i> , 1992b
	Barbate	0.44 - 0.83	González-Mazo <i>et al.</i> , 1997

También se ha observado un aumento de la concentración de LAS en la fase acuosa durante la estación fría, debido a la reducida actividad microbiana (Amano *et al.*, 1991; Takada *et al.*, 1992a; Marcomini *et al.*, 2000). Por tanto, el flujo de LAS hacia la zona costera depende de la época del año que se considere. Así, Takada *et al.*, (1992a) obtuvieron para el estuario del Tamagawa un flujo 5 veces superior en invierno que en verano. Sin embargo, en seguimientos a largo plazo (Kilikidis *et al.*, 1994; Schröder 1995; González-Mazo *et al.*, 1998), las variaciones detectadas en la concentración de LAS se atribuyen principalmente a la influencia de la marea y a la entrada del LAS al sistema en función del momento del día o de la semana (González-Mazo *et al.*, 1998; Quiroga *et al.*, 1989).

Los elevados coeficientes de partición sedimento-agua detectados, que variaron entre 500 y 7000  $\text{L}\cdot\text{Kg}^{-1}$  en estuarios (Terzic y Ahel, 1994), y entre 3000 y 13000  $\text{L}\cdot\text{Kg}^{-1}$  en el medio marino (González-Mazo *et al.*, 1998), muestran la gran capacidad de adsorción del LAS sobre el material particulado. Al igual que en los sistemas continentales, se ha detectado la adsorción preferencial sobre el sedimento de los homólogos más hidrófobos (Takada *et al.*, 1992a; Terzic y Ahel, 1994; González-Mazo *et al.*, 1998). En las proximidades del vertido, los sedimentos contienen mayor proporción de homólogos de cadena más larga ( $\text{C}_{12}$  y  $\text{C}_{13}$ ), detectándose incluso el  $\text{C}_{14}$ LAS (González-Mazo *et al.*,

1998, 1999; Terzic y Ahel, 1994), que constituye menos del 0.5% en el LAS comercial, y a medida que aumenta la distancia disminuye el porcentaje de homólogos de mayor peso molecular. En la bahía de Tokio, el contenido de LAS en los sedimentos es muy bajo ( $<0.01 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) (tabla 5.4), y sin embargo, en otras zonas costeras como la bahía de Cádiz, las concentraciones de LAS son de varias decenas de ppm (González-Mazo *et al.*, 1998). La diferencia en la concentración de LAS detectada en ambas bahías se debe a las diferentes rutas de acceso del LAS al medio (e.g., eliminación de gran parte del LAS en el estuario antes de acceder a la bahía de Tokio, comparado con el vertido directo -sin tratamiento previo- en la bahía de Cádiz); y a las características propias de cada zona, principalmente con respecto a la granulometría del sedimento y a la salinidad del agua. La proporción de LAS retirado de la columna de agua por adsorción depende del contenido en sólidos en suspensión, de la fuerza iónica y de la hidrodinámica de la zona. En el estuario Tamagawa el 10% del LAS detectado estaba adsorbido, sin embargo se encontraron mayores porcentajes para otros sistemas (11-60%)(Terzic y Ahel, 1994; González-Mazo *et al.*, 1998).

**Tabla 5.4. Niveles de LAS en agua, sólidos en suspensión (S.S.) y sedimento en diferentes sistemas marinos costeros.**

Fase	Lugar	[LAS]	Referencia
Agua ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	Bahía de Cádiz	3.5 – 51.2	González-Mazo <i>et al.</i> , 1997
	Caño de Sancti Petri	2.7 - 1687	González-Mazo <i>et al.</i> , 1998
	Laguna de Venecia	1.2 - 296.5	Stalmans <i>et al.</i> , 1990
	Laguna de Venecia	1.4 - 2.4	Marcomini <i>et al.</i> , 2000
	Mar del Norte	$<0.4$ - 1.2	Matthijs y Stalmans, 1993
	Golfo de Thermaikos	10 - 60	Kilikidis <i>et al.</i> , 1994
	Bahía de Tokio	$<3$ - 14	Hon-nami y Hanya, 1980
S.S. ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	Caño de Sancti Petri	14.4 - 5941.0	González-Mazo <i>et al.</i> , 1998
Sedimento ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	Bahía de Tokio	$0.2\pm0.2$	Takada e Ishiwatari, 1991
	Bahía de Tokio	$<0.1$ -0.4	Takada <i>et al.</i> , 1992b
	Caño de Sancti Petri	1.6 - 19.0	González-Mazo <i>et al.</i> , 1997
	Bahía de Cádiz	0.1 - 7	González-Mazo <i>et al.</i> , 1999
	Fiordos daneses	0.8-22	Lillebaelt report, 1998
	Laguna de Venecia	0.1	Marcomini <i>et al.</i> , 2000

De lo anteriormente expuesto, se desprende que los sedimentos son los receptores últimos del LAS no degradado. En la capa superficial, donde las condiciones son aerobias, continúa la degradación (Amano *et al.*, 1992; Reiser *et al.*, 1997) y cuando las condiciones son anóxicas el proceso no tiene lugar (Federle y Schwab, 1992). Bajo nuestro conocimiento, sólo se dispone en la actualidad de un estudio sobre la distribución de los SPC en agua (González-Mazo *et al.*, 1997) y no se dispone de un estudio exhaustivo de la distribución de los distintos homólogos de LAS y SPC en agua, sólidos en suspensión, sedimentos y agua intersticial que permita caracterizar su comportamiento en distintos sistemas.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Los objetivos específicos de este capítulo de la memoria son:

1. Conocer los niveles de LAS y SPC en diversos sistemas litorales, sometidos a vertidos urbanos sin depurar y situados a diferentes latitudes y sometidas a distintos regímenes mareales.
2. Establecer la variación espacial de la concentración de LAS y sus intermedios de degradación, atendiendo tanto a la evolución de sus concentraciones a lo largo de los gradientes de salinidad en cada ecosistema como a la distribución vertical en la columna de agua.
3. Estimar de manera conjunta la tasa de degradación y acumulación de LAS en un sistema litoral (bahía de Cádiz), comparando la entrada de LAS en el sistema con su exportación al entorno oceánico.
4. Determinar la distribución de LAS y SPC en la columna sedimentaria, tanto en la matriz sólida como en el agua intersticial, en lugares sometidos a distinto grado de contaminación de origen urbano.

Parte de los resultados que se exponen a continuación en este capítulo han sido publicados en *Environmental Toxicology and Chemistry*, y en *The Science of the Total Environment*.

## 5.2.MATERIAL Y MÉTODOS

### 5.2.1. Áreas de estudio

La distribución de LAS y SPC se ha caracterizado en cinco estuarios, tres ubicados en la costa Cantábrica: Besaya (ría de Suances), Asón (ría de Santoña) y Oka (ría de Mundaca), dos en el suroeste de la península Ibérica (Guadalquivir y Palmones ) así como en la Bahía de Cádiz, concretamente en el caño de Sancti Petri.

#### **A. Estuarios**

##### *Costa Cantábrica*

**Estuario del Besaya (ría de Suances).** La ría de Suances, también conocida como San Martín de la Arena, está ubicada en la costa central de la comunidad cántabra, en la desembocadura del río Besaya (fig 5.2a). Este río recibe el vertido de las aguas residuales de los núcleos densamente poblados de su entorno, así como residuos procedentes de la industria minera, química, metalúrgica, textil, transformación de madera..., siendo la zona entre Torrelavega y Suances la más afectada por la contaminación. Los principales núcleos de población son Suances (5800hab), Cartes (2100hab) y Torrelavega (59500 hab), ciudad de gran importancia en Cantabria, con un carácter eminentemente industrial y ganadero. En esta zona se seleccionaron 8 puntos de muestreo, cuya ubicación se muestra en la figura 5.2a.

**Estuario del Asón (ría de Santoña).** Se origina en la desembocadura del río Asón, en la parte oriental del litoral de Cantabria (Fig 5.2b). Forman parte de este estuario las rías de Limpias, Rada y la de Treto o Colindres, así como los canales de Boo, Escalante y Argoños entre otros. La Reserva Natural de las Marismas de Santoña y Noja (3866 Ha) y la Zona de Especial Protección para las aves de las marismas de Colindres, son de gran importancia ambiental como zona de descanso para las aves durante los meses de verano. Los principales núcleos urbanos en este área son Santoña (11700 inhab), Laredo (13000), Limpias (1170hab) y Colindres (5500 hab). A lo largo del tramo final de este estuario se seleccionaron 7 puntos de muestreo (figura 5.2b).

**Estuario del Oka (ría de Mundaca).** Está incluido en la Reserva de la Biosfera de Urdaibai (creada en 1984). Es una cuenca fluvial de la costa vizcaína (22041Ha) que

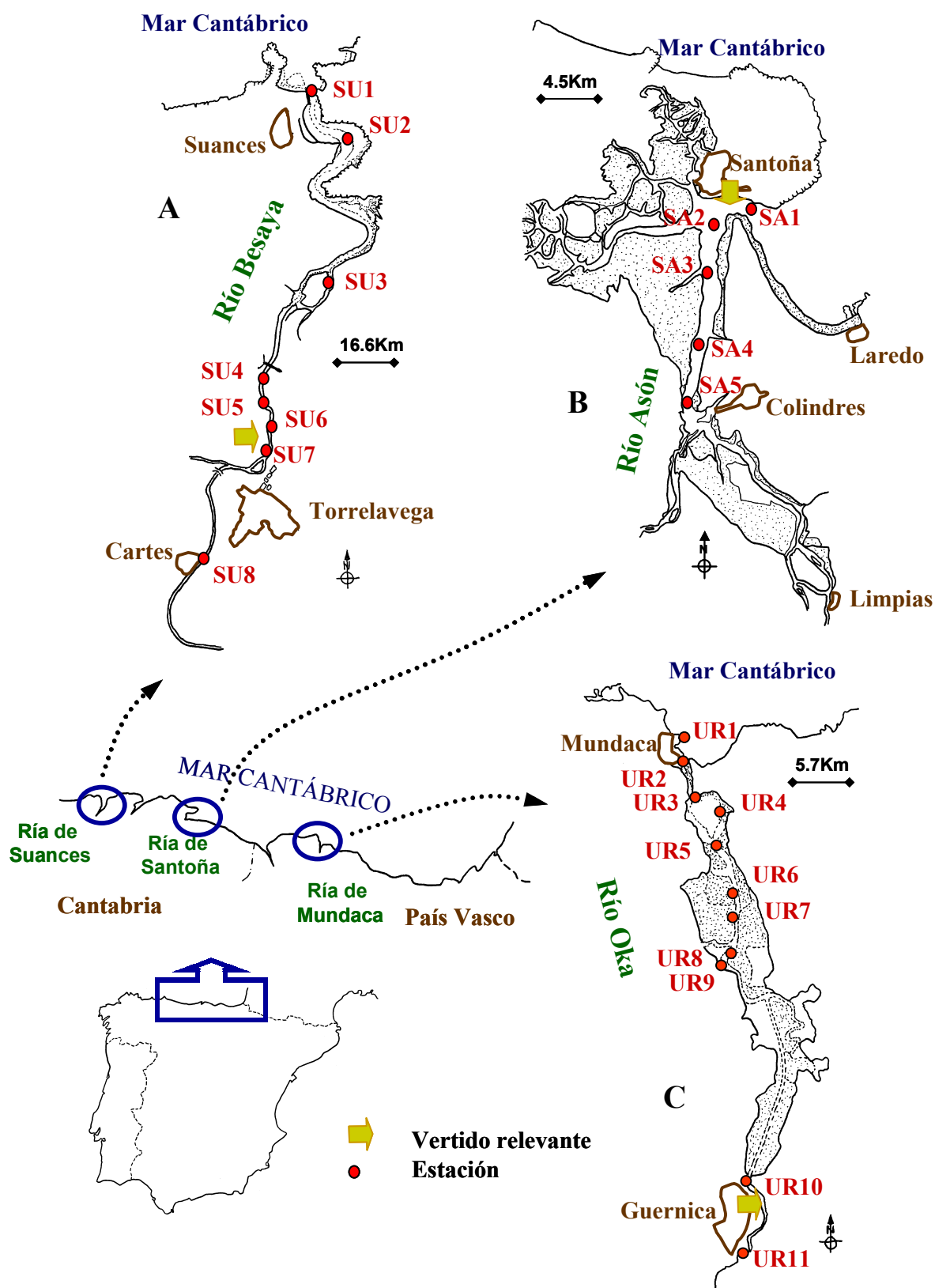


Figura 5.2. Mapas de las rías de Suances (A), Santoña (B) y Mundaca (C) situadas en la costa Cantábrica, mostrando los puntos de muestreo seleccionados en cada caso, así como los núcleos urbanos principales y los vertidos urbanos más relevantes.



consiste en un complejo mosaico de ecosistemas, junto con humedales, robledos, plantaciones comerciales de coníferas y centros urbanos. El río Oka es el eje natural del valle, y a partir de Guernica, nace la ría o estuario donde se mezclan el agua dulce y la salada (figura 5.2c). El recorrido es de unos 12 Km y su desembocadura forma extensos arenales. Por su extensión y grado de conservación constituye no sólo la zona húmeda más importante del País Vasco, sino una de las áreas de especial interés internacional ya que constituye un lugar de reposo e internada de las aves migratorias. Esta zona es de marcado carácter rural, siendo sus principales actividades la agricultura y la pesca. Los principales núcleos de población son Guernica-Lumo (15500 hab.) y Mundaca (1500hab). En esta zona se consideraron 11 puntos de muestreo, cuya ubicación se muestra en la figura 5.2c.

### *Bahía de Algeciras*

**Estuario del Palmones.** El río Palmones tiene una superficie de drenaje de 95 Km<sup>2</sup> y desemboca en la parte noroccidental de la bahía de Algeciras al sur de la provincia de Cádiz (fig 5.3c). El estuario se forma en la desembocadura del río Palmones, sobre materiales de origen aluvial, que está compuesta por materiales arcillosos y controlada y modelada por una flecha arenosa, que avanza en sentido transversal desde un lateral de la desembocadura. La acción de esta flecha, junto con la escasa pendiente existente, provocan una pérdida de energía que favorece la sedimentación. Unas 58Has del sistema de marismas están bajo la fórmula de protección de Paraje Natural. El área protegida, de gran riqueza ornitológica, está próxima a un sistema de dunas costeras de unos 800 metros de longitud y un ancho que varía entre los 100 y los 300 metros. En el entorno de este estuario los pueblos más importantes son Palmones (1800 hab) y la barriada del Rinconillo (Algeciras). La amplitud de la marea es escasa, alcanzando apenas un metro en las de mayor coeficiente. En total se seleccionaron 9 puntos de muestreo a lo largo de todo el estuario, que se muestran en la figura 5.3c.

### *Golfo de Cádiz*

**Estuario del Guadalquivir.** El río Guadalquivir (fig 5.3a) es uno de los más caudalosos de la península Ibérica (flujo medio= 185 m<sup>3</sup>/s), especialmente en época de

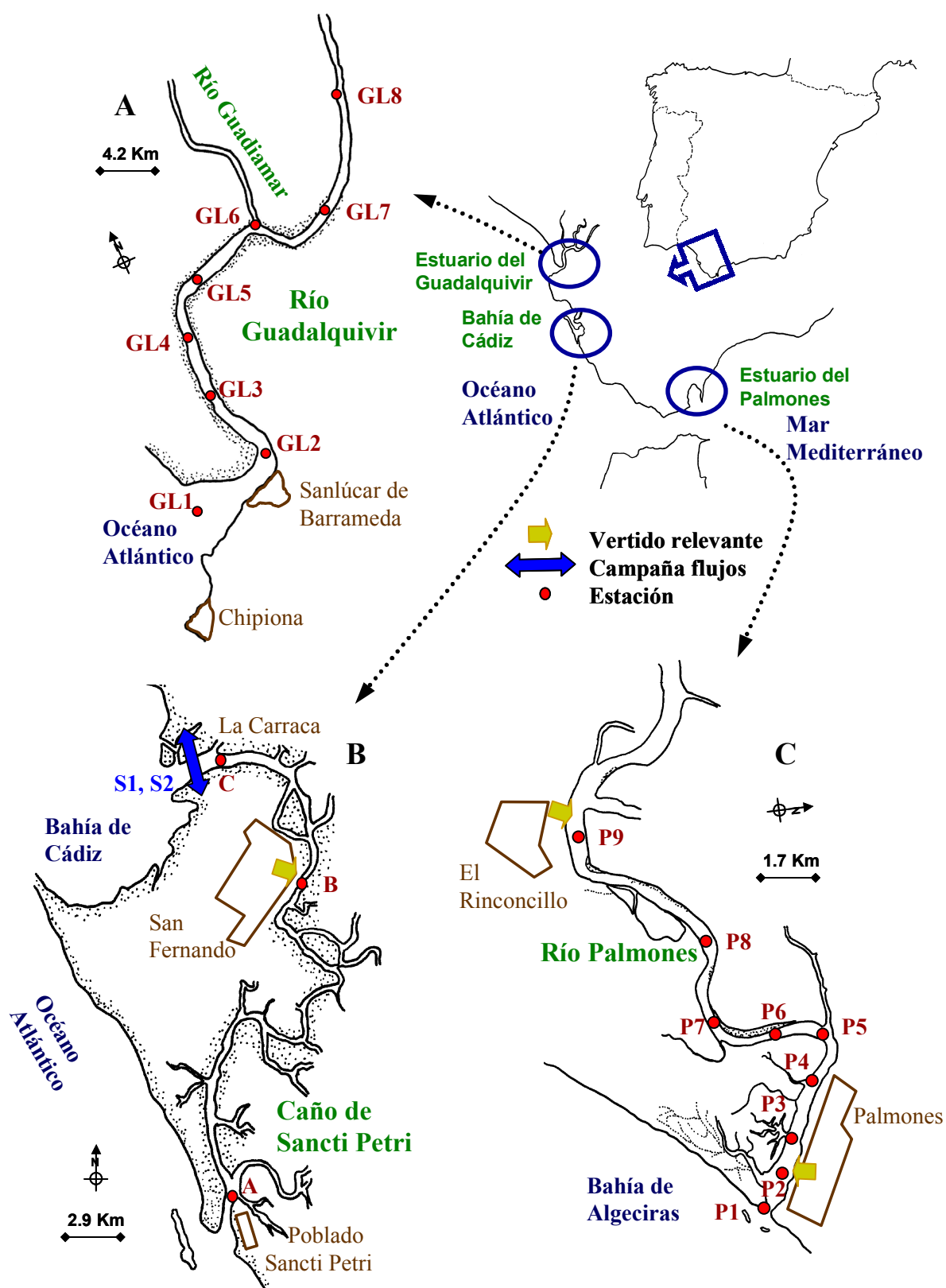


Figura 5.3. Mapas del estuario del Guadalquivir (A), del caño de Sancti petri (B) y del estuario del Palmones (C) situados en el suroeste de la península Ibérica, mostrando los puntos de muestreo seleccionados en cada caso, así como los núcleos urbanos principales y los vertidos urbanos más relevantes.

precipitaciones, y cuenta con un amplio cauce, que en su tramo próximo a la desembocadura supera los 900m de anchura y se reduce progresivamente hacia el interior. Este estuario tiene una longitud de 108 Km y es de mezcla completa, ya que los gradientes verticales de salinidad son pequeños o inexistentes en determinados momentos de marea. El río Guadiamar es el afluente más importante en este tramo. Destacan su actividad pesquera y marisquera, la agricultura (especialmente el arroz) y el turismo. El Parque Nacional de Doñana (50720Ha) y el Parque Natural del Entorno de Doñana (54200Ha) son espacios de gran valor ecológico ubicados a ambas orillas del estuario del Guadalquivir. En este área destacan como núcleos urbanos ubicados en la misma desembocadura Sanlúcar de Barrameda (60000 hab.) y Chipiona (15000 hab.). El área muestreada corresponde a los 38 Km finales del estuario, abarcando el tramo entre su desembocadura y 12 Km por encima de la confluencia con el río Guadiamar. A lo largo del tramo final del estuario se seleccionaron 8 puntos de muestreo cuya ubicación se recoge en la figura 5.3<sup>a</sup>. Todas las zonas estudiadas están sometidas a un acusado régimen mareal de tipo semidiurno con una amplitud de 3 m, exceptuando la bahía de Algeciras, donde la amplitud mareal es menor de 1m. El río Guadalquivir es uno de los más caudalosos de la península Ibérica, mientras que el resto son someros (<5m) y de menor caudal. La granulometría del sedimento varía de la zona fluvial (carácter arcilloso) a la marina (carácter arenoso) en todos ellos, y presentan contenidos de carbono orgánico muy similares (2-2.5%), excepto los de la ría de Santoña (3.5-4.0%). Hasta la fecha del muestreo no se depuraban los vertidos urbanos procedentes de las distintas poblaciones presentes en cada zona.

### **B. Medio marino**

#### *Bahía de Cádiz*

**Caño de Sancti Petri.** Este canal, ubicado en el entorno de la bahía de Cádiz (figura 5.3b), es un brazo de mar que conecta el saco interno de la bahía de Cádiz con el océano Atlántico y suministra agua a una zona de marismas de unas 6000 Ha. Tiene una longitud de 18 Km, una profundidad reducida - entre 2 y 6 m-, y está sujeto a un régimen mareal semidiurno, con una amplitud media de 2.56 m. Es especialmente somero en la zona central, con una profundidad de apenas 50-70cm en la bajamar equinoccial. Por efecto de las condiciones de contorno, se produce un desfase de 20 minutos en la entrada de la onda de marea por cada uno de los extremos del caño de Sancti Petri. Las

dos ondas confluyen aproximadamente a 5 Km del saco interno de la bahía, a la altura de la ciudad de San Fernando, aunque la posición de este punto es variable, dependiendo de la amplitud de la marea y de las condiciones meteorológicas locales. El régimen hidrodinámico a que está sometido condiciona la forma en que se produce la dispersión de los aportes antropogénicos que recibe la zona. Los aportes son principalmente los vertidos residuales urbanos de Chiclana de la frontera (55000 hab.) y San Fernando (100000hab), éstos últimos sin ningún tipo de depuración. Esta área, junto con todo el sistema de marismas de la zona, está incluida en el Parque Natural de la Bahía de Cádiz.

Para el estudio de la distribución en la columna sedimentaria se seleccionaron tres estaciones con distinto grado de exposición al vertido de la ciudad de San Fernando (fig 5.3b), cuyas principales características se muestran en la tabla 5.5. El sedimento de la estación A es arenoso y está sujeto a una intensa bioturbación. La estación B es la más próxima al efluente urbano, y la C se caracteriza por un fuerte régimen de corrientes mareales. En estos dos últimos casos los sedimentos presentan carácter arcilloso y están severamente contaminados. La estación B constituye un caso extremo (Del Valls *et al.*, 1998), ya que sólo se encontraron 2 organismos con un tamaño mayor de 900 µm en 10 muestras tomadas con una draga Van Veen (con cada una se obtiene una muestra de aproximadamente 0-10 cm de profundidad y 250 cm<sup>2</sup> de superficie). La capacidad de irrigación del sedimento es también muy baja, según se deduce a partir de estudios realizados en la misma zona que midieron los flujos de nutrientes a través de la interfase

**Tabla 5.5. Características del sedimento en las estaciones muestreadas en el caño de Sancti Petri. D.P.V.: Distancia al punto de vertido. La porosidad se expresa como la masa de aguas intersticial por unidad de sedimento húmedo.**

	Estación		
	A	B	C
D. P. V. (Km)	13.0	0.1	3.0
Porosidad	0.55 ± 0.06	0.63 ± 0.08	0.67 ± 0.05
Arena (%)	48.5	14.0	22.0
Fango (%)	17.5	30.0	19.0
Arcilla (%)	34.0	56.0	59.0
Carbono orgánico (%)	1.61	2.96	2.85

agua-sedimento (Forja *et al.*, 1994). Como la bioturbación es prácticamente nula, la difusión es el mecanismo principal que controla el transporte vertical de las especies químicas disueltas en el agua intersticial en esta zona litoral.

En esta zona se ha determinado también el balance entrada-salida de LAS y SPC entre el caño de Sancti Petri y el saco interno de la bahía de Cádiz.

### 5.2.2. Sistemática de muestreo y preparación de las muestras

Las técnicas de muestreo empleadas deben asegurar la representatividad de la muestra, especialmente cuando el analito no se distribuye homogéneamente en el medio, como es el caso de los tensioactivos (González-Mazo *et al.*, 1998). Para ello es necesario tomar muestras a distintas profundidades tanto en la columna de agua como en el sedimento. Las muestras de agua se fijaron adicionando un 4% (v/v) de formaldehído (35%) y se mantuvieron 4°C. Las de sedimento se congelaron hasta que fueron tratadas.

#### A. Muestreo en estuarios

El muestreo de la columna de agua en los 5 estuarios se realizó a lo largo de transectos longitudinales, tomando muestras (500mL) a distinta profundidad (superficial, 1, 2 y 3 metros) con una botella oceanográfica tipo Ruttner (Hydro-Bios, Kiel) y de la microcapa superficial (entre 0 y 3-5 mm) con un muestreador superficial (Hydro-Bios, Kiel). Las principales características de los muestreos se recogen en la tabla 5.6.

**Tabla 5.6. Características de los muestreos realizados en los estuarios.**

Estuario	Amplitud mareal (m)	Salinidad	Puntos de muestreo	Fecha de muestreo
Suances	1.29-3.62	0.23-35.02	8	6/6/1998
Santoña	1.25-3.85	18.34-34.46	7	16/6/1998
Mundaca	1.04-3.79	0.19-34.5	11	15/6/1998
Guadalquivir	0.33-3.35	0.95-34.64	8	25/5/1998
Palmones	0.10-0.80	5.81-35.89	9	3/3/1997

Las muestras de sedimento se tomaron usando una draga Van Veen (0-6cm de profundidad), y posteriormente se trasladaron al laboratorio a 4°C.

### ***B. Muestreo de la columna sedimentaria***

En cada estación se tomaron 10 testigos de 40mm de diámetro interno y 40cm de longitud con un tomatestigos de gravedad. Se mantuvieron en posición vertical y a 4°C durante su transporte al laboratorio, donde fueron congelados y almacenados hasta su análisis. A continuación se cortaron en secciones de 1cm de espesor, de las que se seleccionaron 12 entre 0 y 31cm de profundidad. El agua intersticial de cada sección se obtuvo por centrifugación a 39200 g durante 30 min. La fase acuosa se separó por decantación, obteniendo una recuperación entre el 75 y el 85% del total, y la fase sólida se secó en una estufa a 85 °C hasta peso constante. Las muestras de los distintos testigos correspondientes a una misma estación y profundidad se unieron, obteniéndose para cada caso una sola muestra de mayor tamaño y representatividad.

### ***C. Exportación- importación de LAS en el caño de Sancti-Petri***

Las campañas de muestreo (S1, S2) realizadas en ambas bocas del caño de Sancti Petri (figura 5.3c) se desarrollaron a lo largo de ciclos mareales completos (12 horas) con distintos coeficientes de marea. Las muestras de agua (500mL) se tomaron cada hora a distintas profundidades (microcapa superficial, superficie, media y fondo), y las muestras de sólidos en suspensión (5L) cada 2 horas de la capa superficial. Estas muestras se tomaron con los mismos sistemas de muestreo que se han expuesto para los estuarios. Las muestras de superficie se tomaron a un metro de la interfase agua-atmósfera, las de fondo a un metro del fondo, y las de la profundidad media, como su nombre indica a una profundidad intermedia entre las otras dos. Esta sistemática de muestreo se aplicó durante todo el ciclo de marea. Las principales características de estos muestreos se recogen en la tabla 5.7.

Durante estos muestreos se ha obtenido de forma simultánea un registro de la velocidad de corriente y de la altura de marea. Estos datos se han utilizado para el cálculo del balance de masas (entrada- salida) de LAS y los SPC entre el caño y el saco interno de la bahía de Cádiz.

**Tabla 5.7. Principales características de las campañas desarrolladas en la boca norte del caño de Sancti Petri: La Carraca.**

Muestreo	Estación	Fecha muestreo	Amplitud mareal	[S.S.] (mg·L <sup>-1</sup> )
S1	La Carraca	7/6/1999	1.02 - 2.89	22.6±4.9
S2	La Carraca	7/13/1999	0.32 - 3.41	20.6±12.7

#### ***D. Tratamiento de las muestras***

Las muestras de sedimento seco se molturaron con un molino de bolas de óxido de zirconio (Fritsch) y se pasaron a través de un tamiz de 63 µm de luz de malla. Entre 6 y 10 g de sedimento se colocaron en cartuchos de extracción Soxhlet, previamente lavados con metanol, y la extracción se realizó usando 60 mL de metanol durante 12 horas. A continuación los extractos se llevaron hasta sequedad con un rotavapor, y el residuo seco se redisolvió en 150 mL de agua tibia (50-55°C) con la ayuda de un baño de ultrasonidos.

Para obtener los sólidos en suspensión, las muestras (5L) se pasaron a través de un filtro de fibra de vidrio con un diámetro de poro medio de 0.45µm (AP40) previamente lavado con agua Milli-Q. El uso de filtros de menor tamaño de poro (0.22µm) se desestimó ya que sólo mejoraban entre un 1 y un 2% la masa de sólidos en suspensión obtenida, y aumentaban en exceso la duración de la filtración. Los filtros se secaron a 70°C durante 12h y posteriormente se molturaron a mano: La extracción de LAS y SPC se realizó por la técnica Soxhlet a escala micro.

Las muestras de agua (agua, agua intersticial o el extracto redissuelto en agua del sedimento o sólidos en suspensión), se purificaron y preconcentraron según el método propuesto en la presente memoria para la determinación simultánea del LAS y los SPC (capítulo 2). La cuantificación se realizó utilizando patrones externos.

### 5.3. Resultados y discusión

#### 5.3.1. Niveles de LAS y SPC en sistemas estuáricos y marinos

Las concentraciones de LAS y SPC son, en general, bajas a lo largo de los distintos estuarios y fases analizados, excepto en lugares muy próximos a puntos de descarga de aguas residuales sin tratar (Tabla 5.8). La variabilidad encontrada es consecuencia de las características específicas de los lugares de estudio, y no se han detectado diferencias significativas entre los sistemas del norte y del sur de la península Ibérica.

**Tabla 5.8. Concentraciones detectadas para LAS y SPC en agua ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y sedimento ( $\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$ ), y contenido en carbono orgánico del sedimento en las distintas zonas de estudio.**

Zona	Fase	LAS	SPC	C.O. (%)
Ría de Suances	Agua	12 - 527	2 - 42	
	Sedimento	25-556	65-175	2.01-2.10
Ría de Santoña	Agua	9 - 49	n.c. - 20	
	Sedimento	369-1183	132 - 409	3.66-3.94
Ría de Mundaca	Agua	2 - 718	n.c. - 20	
	Sedimento	451-1353	138-148	1.27-2.47
Estuario del Palmones	Agua	14 - 38	10 - 49	
	Sedimento	1141-5080	236-418	2.00-2.55
Estuario del Guadalquivir	Agua	4 - 18	n.c. - 12	
	Sedimento	-	-	-
Caño Sancti Petri	Agua	10 - 2490	5 - 50	
	Sedimento	300-26120	45	2.9-3.2

n.c.: detectado pero no cuantificado

Las mayores concentraciones de LAS en agua (>500ppb) se han encontrado en las rías de Suances y de Mundaca, y en el caño de Sancti Petri (Tabla 5.8), como consecuencia de la presencia de vertidos de aguas residuales sin depurar de distintos núcleos urbanos importantes: Torrelavega (57000 hab.), Guernica-Lumo (15500 hab.) y San Fernando (100000 hab.) respectivamente. En algunos casos las concentraciones son mayores, incluso, que las de otras áreas altamente contaminadas (Takada y Ogura, 1992; Terzic y Ahel, 1994; Marcomini *et al.*, 2000), como consecuencia de la reducida profundidad y de la baja tasa de renovación de las cuencas receptoras en las



proximidades de los puntos de descarga. En el resto de las zonas la concentración fue inferior a  $50\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , debido a la ausencia de vertidos de aguas residuales importantes y a la mayor tasa de renovación de sus aguas.

En lo que respecta a los SPC, se detectaron en todas las muestras y su concentración total (suma de todos los homólogos) fueron, por lo general, inferiores a  $50\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . En algunos casos, las concentraciones encontradas están por debajo del límite de detección ( $0.2\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

En las muestras de agua se han detectado homólogos del LAS de 10 a 13 átomos de carbono (Fig. 5.4), siendo los más abundantes el  $\text{C}_{11}\text{LAS}$  y el  $\text{C}_{12}\text{LAS}$ . Con respecto al LAS comercial, se observa en todas las zonas un aumento en el porcentaje de los homólogos de cadena más corta, y un descenso de los de mayor peso molecular,  $\text{C}_{12}\text{LAS}$  y  $\text{C}_{13}\text{LAS}$ , como consecuencia de su mayor degradación y afinidad por el sedimento. En este sentido, el homólogo  $\text{C}_{14}\text{LAS}$  ha sido totalmente eliminado de la columna de agua.

La biodegradación del LAS en la columna de agua es manifiesta, teniendo en cuenta que se han detectado en todas las zonas intermedios de degradación (SPC) de 4 a 13 átomos de carbono en su cadena carboxílica. En general, las mayores concentraciones corresponden a los homólogos de longitud de cadena intermedia, entre 5 y 8 átomos de carbono, como se muestra en la figura 5.5 para algunas estaciones (P9, SU5 y UR7) de las distintas zonas (estuario del Palmones, ría de Suances y Mundaca, respectivamente). Estos intermedios constituyen más del 70% de los SPC detectados, particularmente el  $\text{C}_6\text{SPC}$  ( $18.1\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Estos resultados están en concordancia con los obtenidos en los ensayos de biodegradación, expuestos en la presente memoria, y con los realizados previamente por diversos autores (Taylor y Nickless, 1979; Field *et al.*, 1992; Knepper y Kruse, 2000), y confirman la denominación de estos compuestos como “intermedios clave”, teniendo en cuenta su persistencia en el proceso de degradación del LAS. Los SPC de mayor peso molecular estuvieron presentes en el medio a bajas concentraciones ( $<5\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), y únicamente se detectaron en zonas muy contaminadas, cercanas a efluentes de aguas residuales sin tratar (estación B, del caño de Sancti Petri y estación SA2 de la ría de Santoña en la figura 5.5). En la ría de Suances (estación SU4) se han detectado concentraciones significativas de estos homólogos (ej.:  $\text{C}_{12}\text{SPC}$ ;  $\text{C}_{13}\text{SPC}$ ) como consecuencia del continuo aporte de LAS que existe en esta zona. La confirmación de su presencia en muestras de agua se realizó por HPLC/MS. Como ejemplo se presenta un cromatograma correspondiente a la muestra de agua SU5

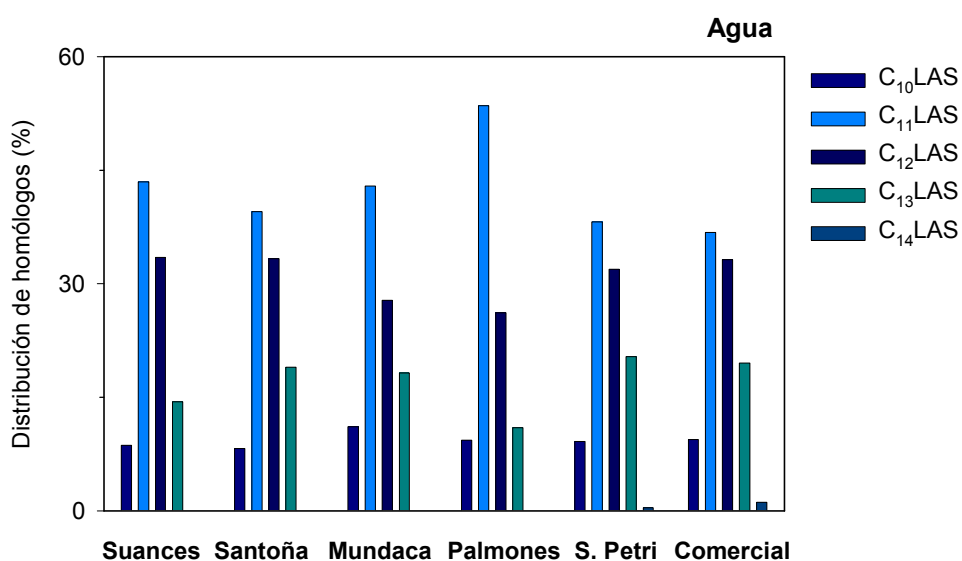


Figura 5.4. Distribución de homólogos del LAS, expresada en porcentaje respecto al total, en muestras de agua de los distintos sistemas litorales estudiados y para el LAS comercial.

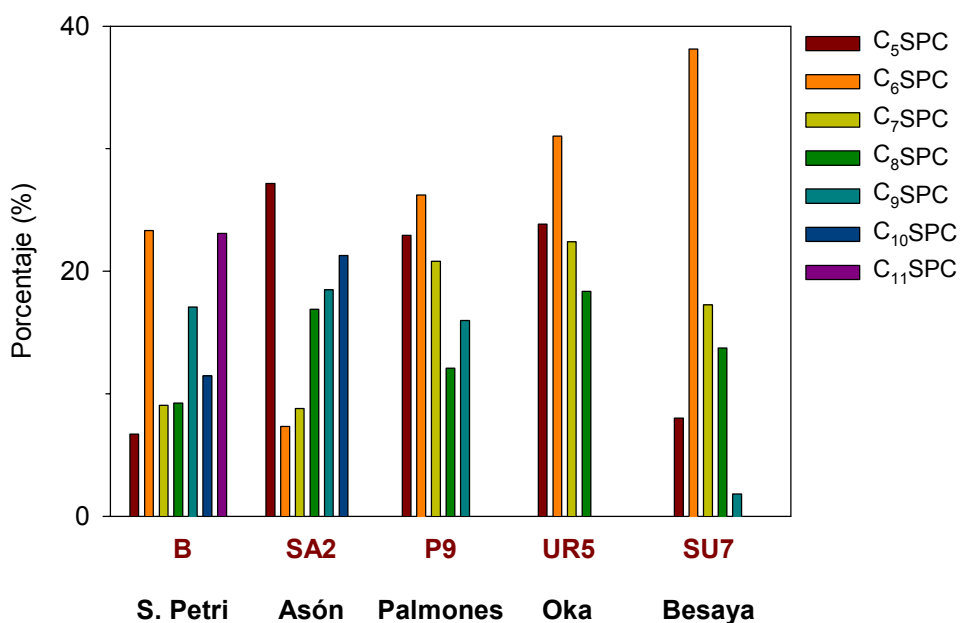
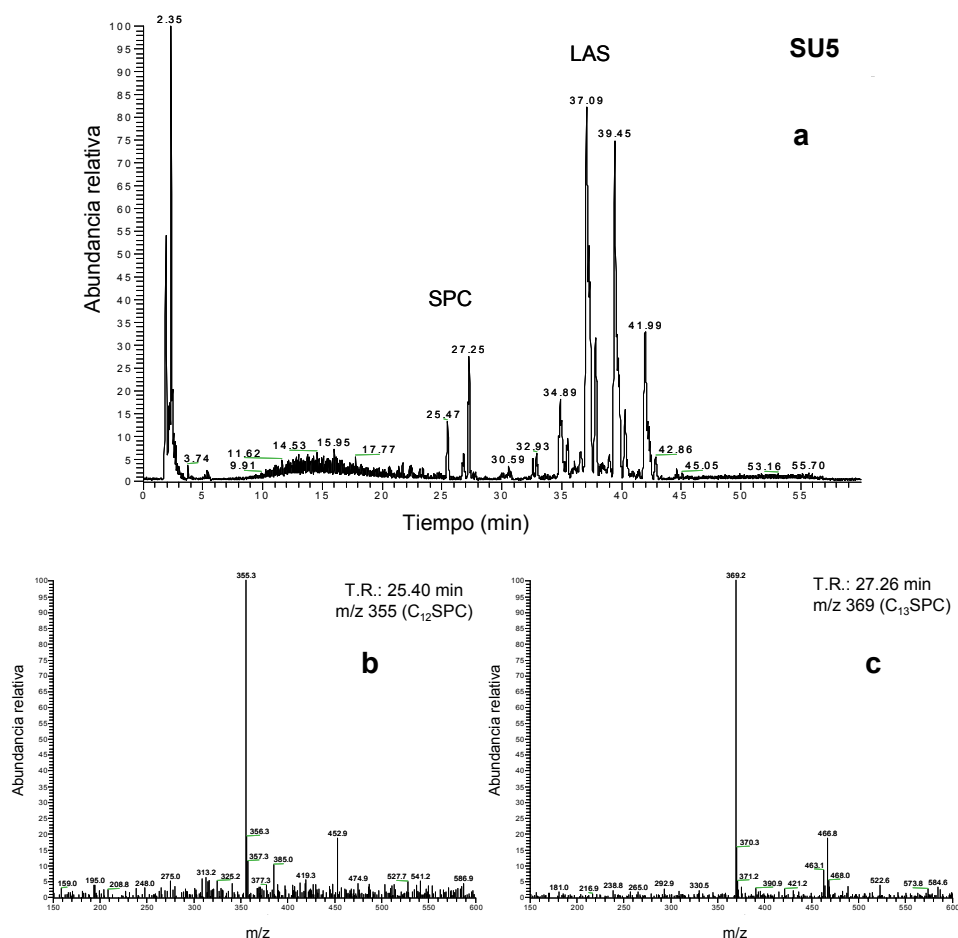


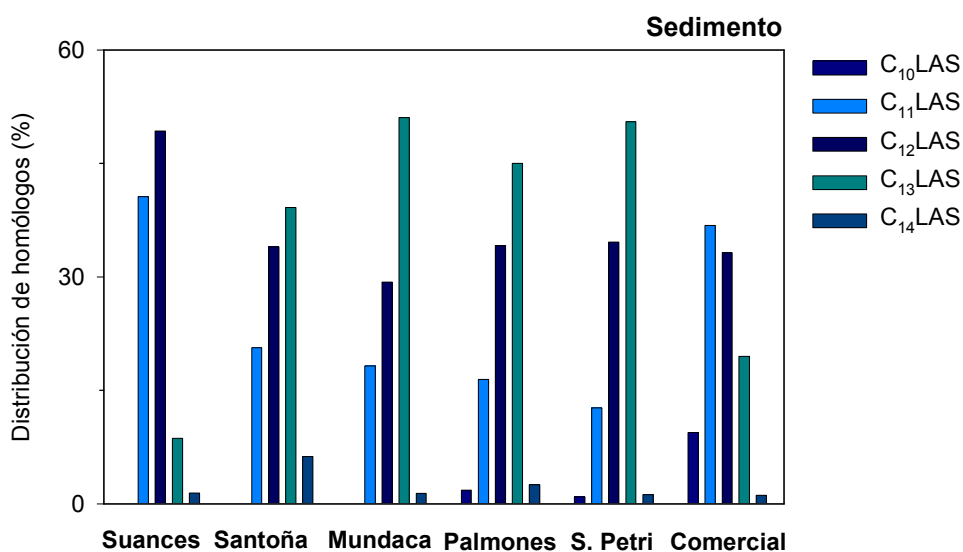
Fig. 5.5. Distribución de los homólogos de SPC detectados en muestras de agua de los sistemas litorales estudiados.

de la ría de Suances (Figura 5.6a). En las figuras 5.6b y 5.6c se recogen también los espectros del C<sub>12</sub>SPC y del C<sub>13</sub>SPC, que tienen una relación masa/carga de 355 y 369 respectivamente.

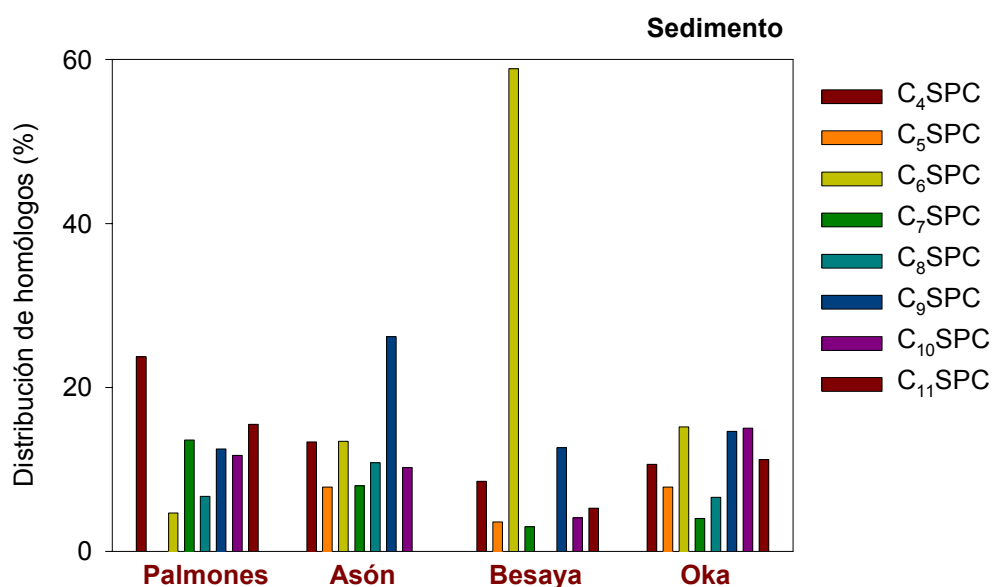


**Figura 5.6. Cromatograma obtenido por cromatografía líquida con espectrometría de masas (a) para una muestra de agua de la ría de Suances (SU4). También se muestran los espectros de m/z correspondientes a los homólogos C<sub>12</sub>SPC, m/z 355 (b) y C<sub>13</sub>SPC, m/z 369(c), detectados en esta estación.**

Las concentraciones de LAS y SPC detectadas en sedimentos (Tabla 5.8), mayores que las de la columna de agua, confirman su afinidad por la fase sólida. En las muestras analizadas -próximas a los núcleos urbanos- las concentraciones totales de LAS más comunes oscilan entre 0.2 y 5  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , mientras que para el SPC oscilan entre 20 y 200  $\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$ . La concentración máxima de LAS en sedimento superficial (26  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) se detectó en el caño de Sancti Petri, junto al vertido de aguas residuales sin depurar procedente de la ciudad de San Fernando (estación B). En el sedimento (Fig. 5.7) se han detectado todos los homólogos del LAS (C<sub>10</sub>-C<sub>14</sub>), predominando en todas las zonas, al contrario que para las muestras de agua, los de mayor peso molecular (C<sub>12</sub>LAS y C<sub>13</sub>LAS). Como resultados significativos podríamos destacar la presencia de C<sub>14</sub>LAS que constituye más del 1% del total en todas las muestras, alcanzando en la ría de Santoña (zona con mayor contenido de carbono orgánico), el 6% (mirar figura) así como la no



**Figura 5.7a.** Distribución de homólogos del LAS (%) en muestras de sedimento de los distintos sistemas litorales estudiados y para el LAS comercial.



**Figura 5.7b.** Distribución de homólogos del SPC (%) en muestras de sedimento de los distintos sistemas litorales estudiados.

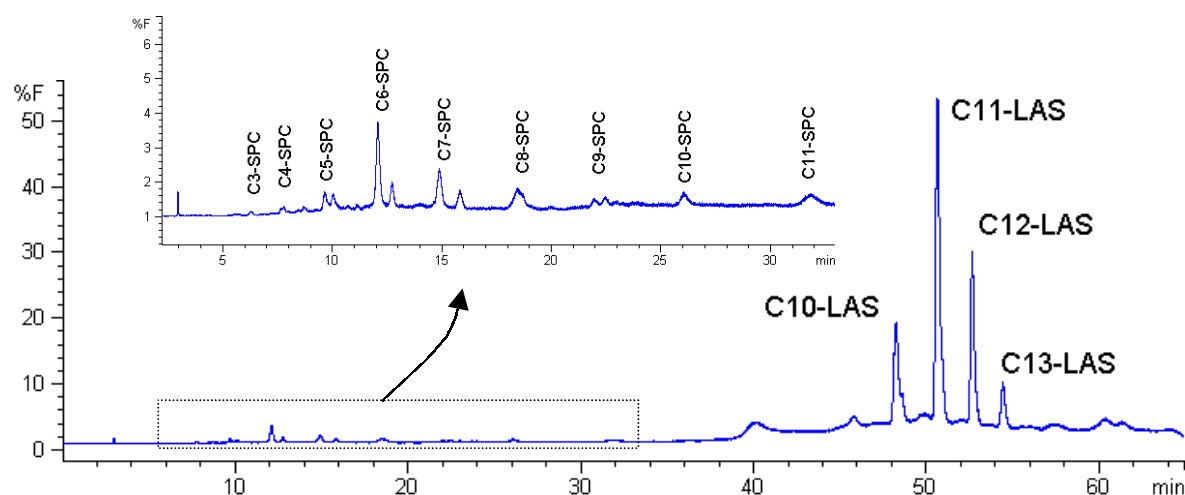
detección del C<sub>10</sub>LAS en los estuarios del Besaya y del Asón. En el sedimento están presentes los ácidos sulfofenilcarboxílicos de 4 a 13 átomos de carbono, correspondiendo las concentraciones más altas ( $47.1-119.3 \mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$ ) a los homólogos de cadena carboxílica más larga (C<sub>9</sub>-C<sub>11</sub>) debido a su mayor afinidad por la fase sólida y la menor

disponibilidad para la biodegradación en forma adsorbida. La presencia del C<sub>13</sub>SPC demuestra que la  $\omega$ -oxidación es la primera etapa en el proceso degradativo, tal y como indicaron previamente González-Mazo et al., (1997).

**Tabla 5.9. Coeficiente de partición (L·Kg<sup>-1</sup>) de los homólogos del LAS en las zonas más próximas a núcleos de población de distintos estuarios y rías estudiados de la península Ibérica.**

Área de estudio	Coeficiente de partición (L·Kg <sup>-1</sup> )					
	C10-LAS	C11-LAS	C12-LAS	C13-LAS	LAS total	C.O. (%)
Suances	-	10.8	17.0	6.9	11.6	2.10
Mundaca	-	-	551.6	111.8	178.4	1.27-2.47
Palmones	19.5	77.8	330.3	1036.5	252.9	2.55
C. Sancti Petri	254.8	1023.1	3020.3	19253.0	3093.7	3.3

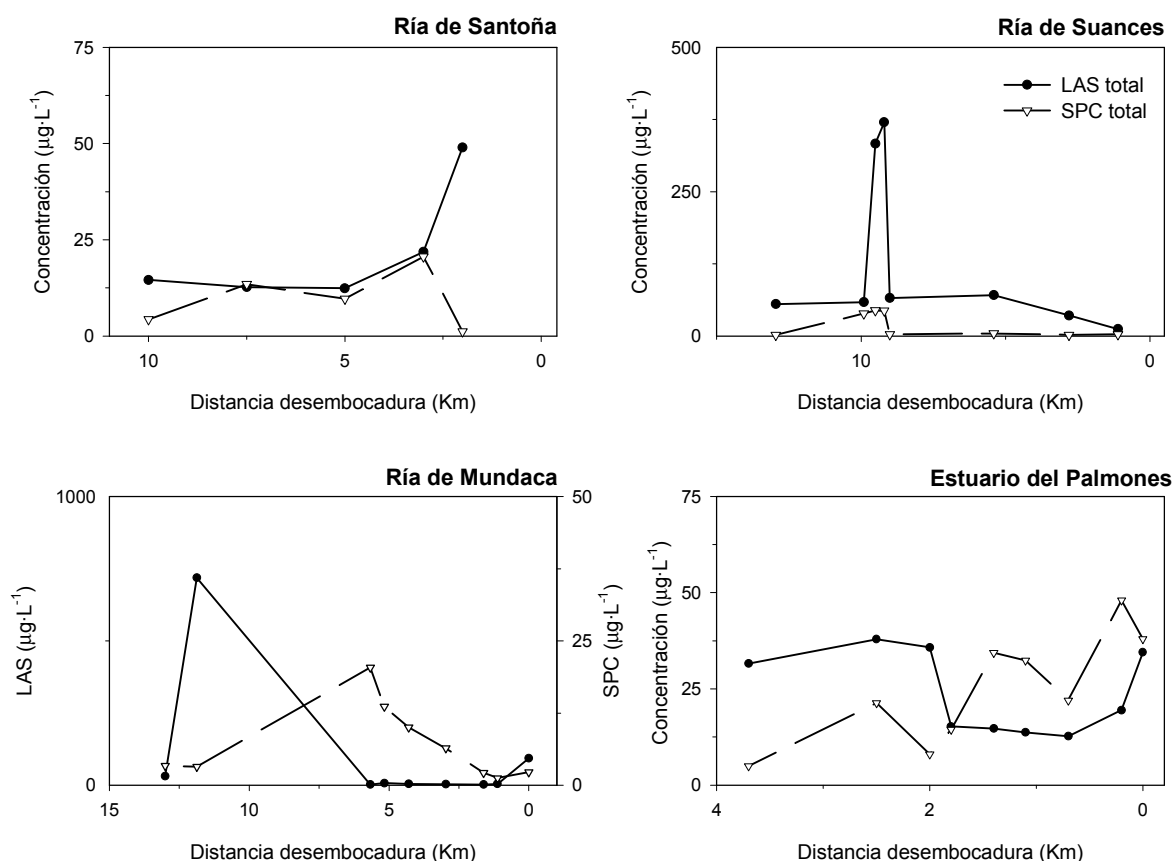
En la figura 5.8 se muestra el cromatograma obtenido para una muestra de agua (procedente de la estación SU5), donde aparecen todos los homólogos de SPC de 3 a 11 átomos de carbono en la cadena carboxílica, y los homólogos de LAS. La identificación del C<sub>7</sub>SPC, para el que no se disponían patrones, se realizó por HPLC-MS, siguiendo el procedimiento descrito por González-Mazo et al., (1997), y se cuantificó suponiendo una respuesta similar al C<sub>8</sub>SPC.



**Figura 5.8. Cromatograma (cromatografía líquida con detector de fluorescencia) de una muestra de agua de la estación SU5 (ría de Suances), con una ampliación de la parte donde se detectan los ácidos sulfofenilcarboxílicos.**

### 5.3.2. Distribución espacial del LAS y SPC en sistemas estuáricos

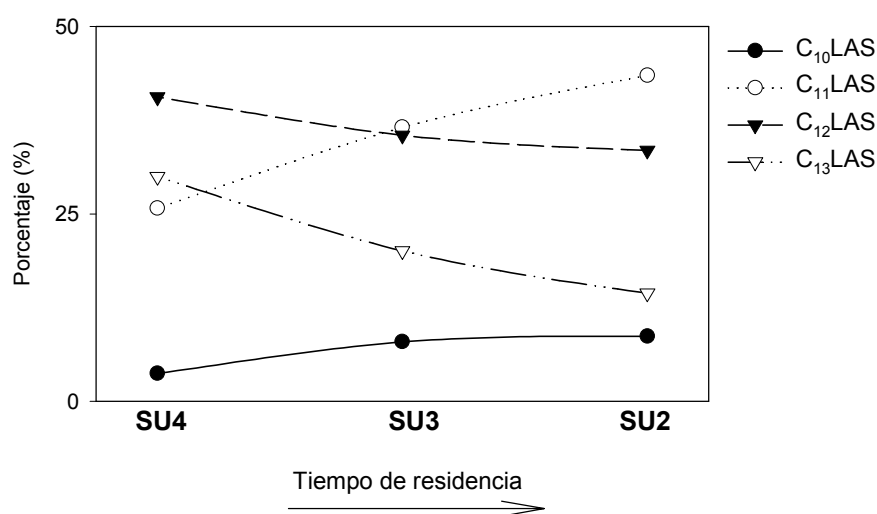
En la figura 5.9 se muestra la variación espacial de la concentración total de LAS ( $\Sigma C_{10}-C_{13}LAS$ ) y de SPC ( $\Sigma C_4-C_{13}SPC$ ) en agua para las rías de Suances, Santoña y Mundaca, así como para el estuario del Palmones. La concentración máxima de LAS se ha detectado en las proximidades de los núcleos de población, y disminuye de forma acusada al aumentar la distancia al punto de vertido, como consecuencia de su eliminación de la columna de agua. En la ría de Mundaca y en el estuario del Palmones, la concentración de SPC observada aumenta con la distancia al punto de vertido, alcanzando el máximo a unos pocos kilómetros río abajo, y después disminuye progresivamente. Esta variación, previamente descrita en otras zonas, se puede explicar por el aumento del tiempo de residencia del LAS en el medio a mayores distancias del efluente (González-Mazo *et al.*, 1997). Sin embargo en zonas más estancadas (ría de



**Figura 5.9. Variación de la concentración total (suma de todos sus homólogos) de LAS y del SPC frente a la distancia, en las rías de Suances, Santoña y Mundaca, y en el estuario del Palmones.**

Suances), la concentración máxima de SPC aparece en la estación más cercana al punto de vertido y coincide con la de LAS (Fig. 5.9). En el estuario del Guadalquivir las concentraciones totales de LAS y SPC han sido inferiores a  $20\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  y han presentado variaciones espaciales poco significativas con la distancia, ya que se trata de un sistema prácticamente homogéneo debido a las intensas corrientes existentes en esta área y a la ausencia de vertidos urbanos relevantes, al menos, en el tramo más fluvial del estuario.

En general, la proporción de homólogos de LAS en agua no varió significativamente con la distancia al punto de vertido, aunque en algunas zonas características de la ría de Suances, se observó un aumento en el porcentaje de los homólogos más cortos con la distancia (Fig. 5.10). Las distintas oxidaciones que tienen lugar en el proceso de biodegradación del LAS se pueden apreciar en la distribución de los homólogos del SPC con la distancia (tiempo de residencia) para el estuario del Oka (Fig. 5.11). A cierta distancia del vertido (6 Km río abajo) encontramos muchos de los SPC monocarboxílicos (estación UR7) y, a medida que nos alejamos, aumenta el porcentaje de los SPC de cadena intermedia ( $\text{C}_6\text{-C}_8$ ) llegando a constituir en la desembocadura (UR1) el 100% de los SPC detectados (Fig. 5.11). Las observaciones de campo coinciden con lo obtenido en los ensayos de degradación presentados en esta memoria y por otros autores en agua dulce (Di Corcia *et al.*, 1999). Los ácidos sulfofenilcarboxílicos de mayor peso molecular son rápidamente degradados a SPC de menor peso molecular (primeras  $\beta$ -oxidaciones) y no son detectados comúnmente en el medio.



**Figura 5.10.** Distribución espacial de los homólogos de LAS, expresada como porcentaje del LAS total, en el agua de tres estaciones de la ría de Suances.

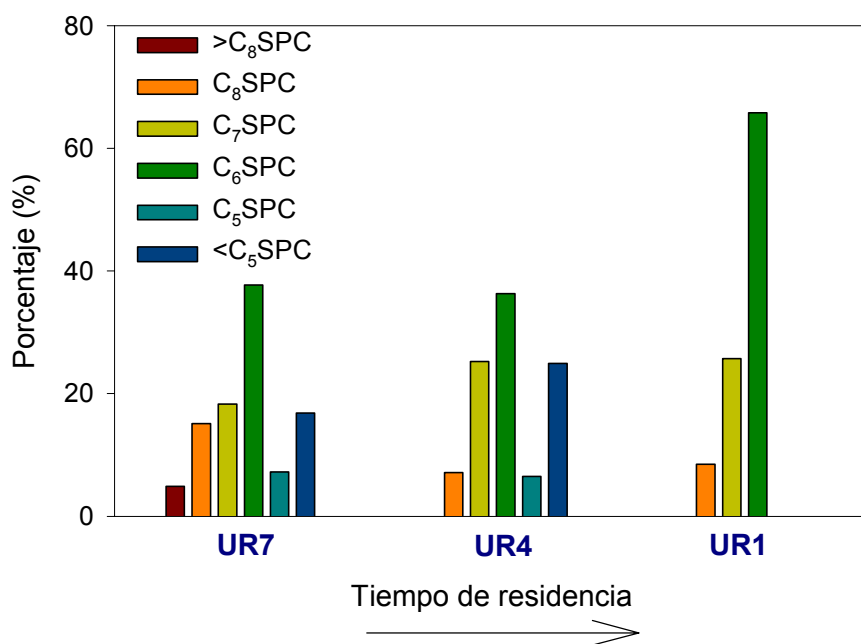


Figura 5.11. Distribución espacial de los homólogos de SPC, expresada como porcentaje respecto al total de los ácidos sulfonilcarboxílicos presentes, en el agua de tres estaciones de la ría de Mundaca.

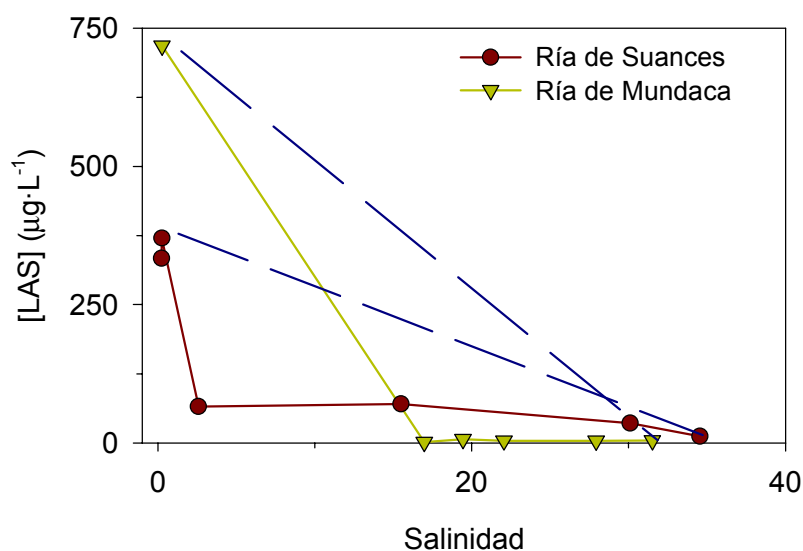


Figura 5.12. Variación de la concentración total del LAS (suma de todos sus homólogos) con la salinidad desde el punto principal de vertido en las rías de Suances y Mundaca. La línea discontinua indica como sería la reducción de la concentración en cada tramo de estos estuarios únicamente por dilución.



Los diferentes procesos que intervienen en la eliminación del LAS de la fase disuelta a lo largo de los estuarios, hacen que su comportamiento sea no conservativo. La biodegradación, adsorción sobre el material particulado (sólidos en suspensión y sedimentos) y la precipitación, provocan un acusado descenso de la concentración de LAS frente a la salinidad (Fig. 5.12) mucho mayor que el esperado simplemente debido al proceso de dilución (indicado en la figura por una línea discontinua).

Los perfiles verticales de la concentración de los homólogos del LAS en la columna de agua (Figuras 5.13<sup>a</sup>, 5.13b y 5.13c) muestran que estos compuestos no se distribuyen homogéneamente. Las variaciones encontradas dependen principalmente de la mezcla física en la columna de agua y de la existencia de puntos de descarga de aguas residuales en superficie o en profundidad. En una de las estaciones de la ría de Suances (SU6) el efluente de aguas residuales se encuentra sumergido unos 3 metros y las mayores concentraciones de LAS se detectan a esa profundidad (Fig. 5.13a). A poca distancia río abajo de esta zona (SU4), los homólogos del LAS se distribuyen homogéneamente en la columna de agua (Fig. 5.13b), y ya a unos 4 Km del vertido se aprecia de nuevo una clara estratificación en la distribución del LAS (SU3). En este punto las concentraciones de LAS más altas se detectaron en la microcapa superficial mostrando un perfil vertical típico de una molécula de carácter tensioactivo (Fig. 5.13c). Este comportamiento es posible ya que el estuario estaba claramente estratificado en el momento del muestreo, como indican los perfiles detectados de salinidad, que en esta estación fueron de 15.49, 15.50, 33.60 y 33.84 para 0-5mm, 0.25m, 1.5m y 2.5m de profundidad, respectivamente. Una distribución similar ha sido descrita previamente tanto en estuarios (Terzic y Ahel, 1994) como en el medio marino (González-Mazo *et al.*, 1998).

Los homólogos de SPC se distribuyen de forma más homogénea que los del LAS en el medio (Figuras 5.13d, 5.13e y 5.13f) debido a la pérdida del carácter tensioactivo. En general, las concentraciones más altas de los ácidos sulfonilcarboxílicos SPC se han detectado donde hay una mayor presencia de LAS, puesto que es allí donde se generan.

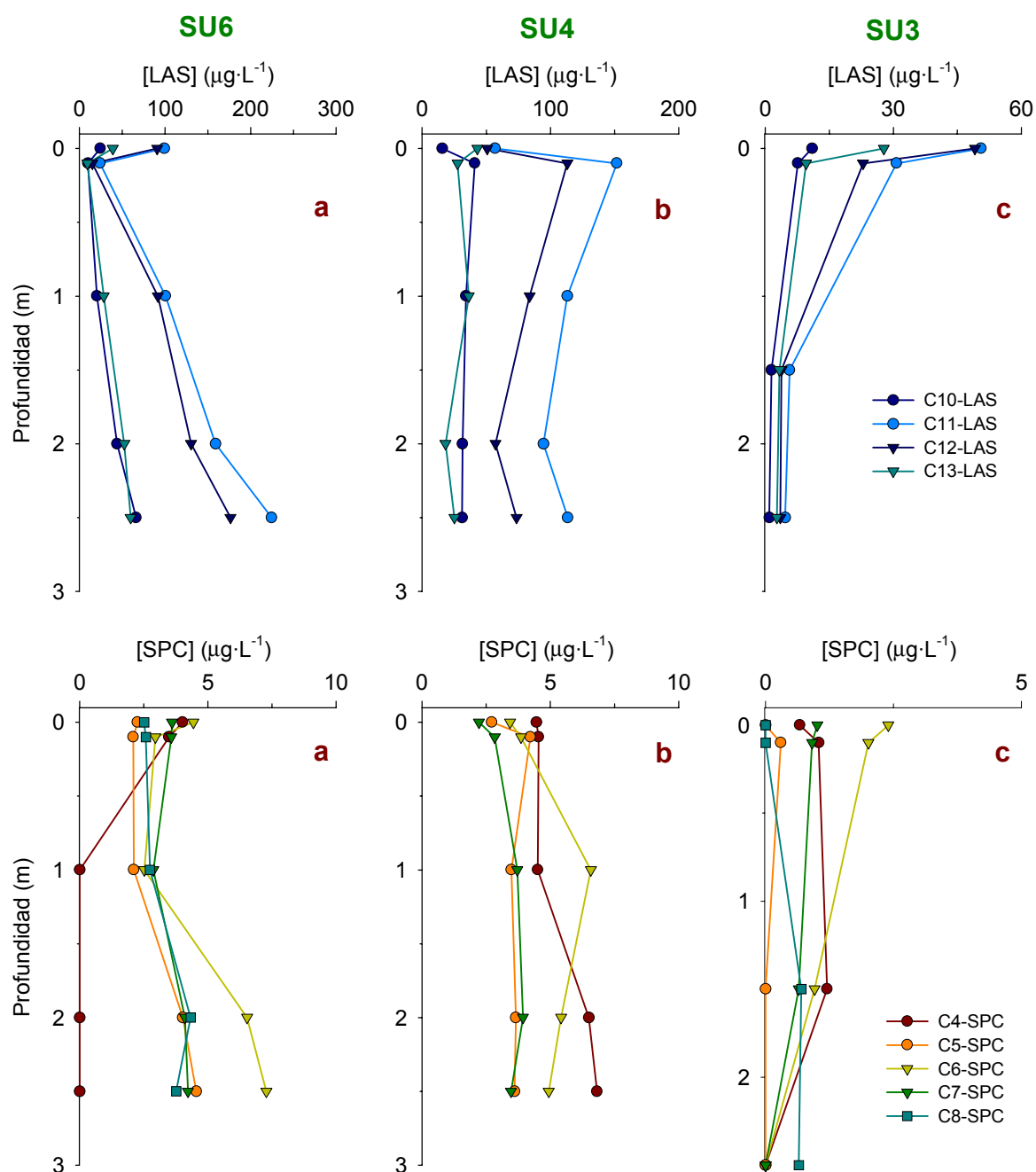
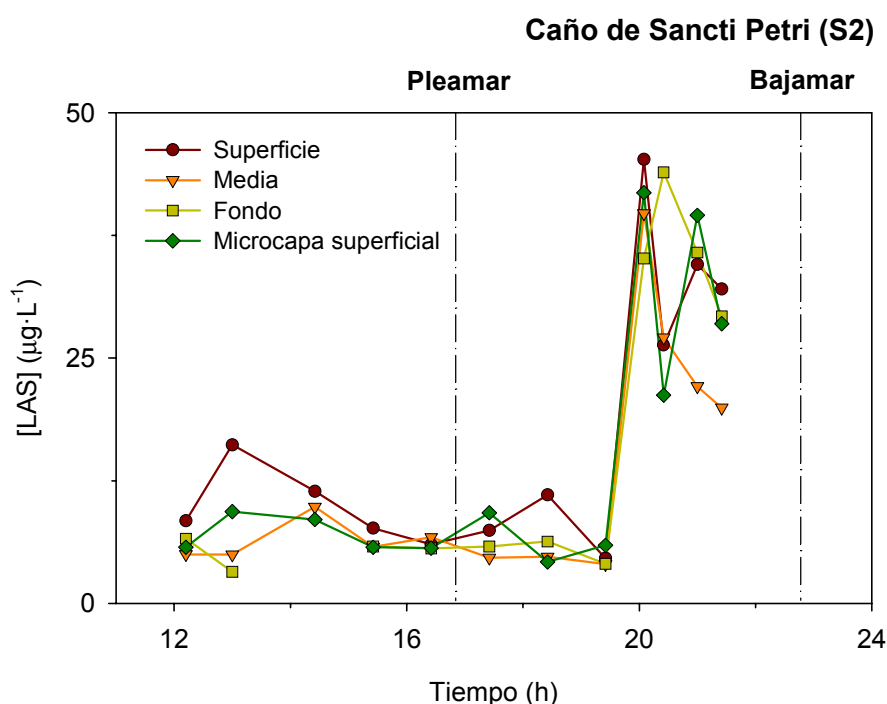


Figura 5.13. Perfiles verticales de la concentración de los homólogos del LAS y SPC en la columna de agua de tres estaciones de muestreo de la ría de Suances: (a) SU6, (b) SU4 y (c) SU3.

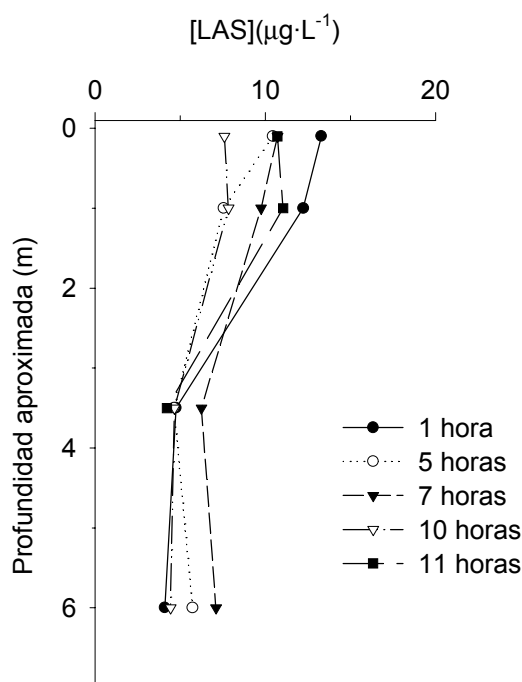
### 5.3.3. Distribución temporal de LAS y SPC en la columna de agua: caño de Sancti Petri (bahía de Cádiz)

La concentración media de LAS, a lo largo de un ciclo mareal, en la zona norte del caño de Sancti Petri en su confluencia con el saco interno de la bahía (La Carraca, Fig. 5.3b) fue de  $8.7 \pm 2.3 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  y  $17.6 \pm 13.5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  en agua, y de  $56.8 \pm 14.2 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$  y  $114.8 \pm 48.8 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$  en los sólidos en suspensión, para los muestreos S1 y S2 respectivamente. Las concentraciones más altas se detectaron durante el muestreo realizado con el mayor coeficiente de marea, como consecuencia de la mayor influencia del vertido de aguas residuales de la ciudad de San Fernando (Fig. 5.3b) en esas condiciones.

Las mayores concentraciones de LAS se detectaron en marea decreciente (S2, figura 5.14), como consecuencia de la salida de LAS procedente del vertido hacia la bahía. El LAS se distribuye homogéneamente con la profundidad debido a la eficiencia del proceso de mezcla en la columna de agua en esta zona. En cambio para el menor coeficiente de marea se observa una cierta afinidad por la capa más superficial como podemos observar en la figura 5.15.



**Figura 5.14.** Variación de la concentración de LAS a distintas profundidades (microcapa superficial, superficie, media y fondo) a lo largo de todo el ciclo mareal en la boca norte (estación de muestreo N) del caño de Sancti Petri.



**Figura 5.15.** Distribución vertical de la concentración de LAS en la columna de agua en distintos momentos (se indican las horas desde el inicio del muestreo) del ciclo mareal durante el muestreo S1 (pequeño coeficiente de marea) en la boca norte del caño de Sancti Petri.

Teniendo en cuenta el contenido de sólidos en suspensión (unos  $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  de media), el porcentaje de LAS adsorbido representa un  $12.2 \pm 2.3\%$  y  $12.2 \pm 4.1\%$  del total para los muestreos S1 y S2 respectivamente. En general, la proporción de LAS asociado a los sólidos en suspensión está dentro del amplio intervalo obtenido (1-59%) en distintos sistemas estuáricos y marinos (Takada y Ogura, 1992; Terzic y Ahel, 1994; González-Mazo *et al.*, 1998), como consecuencia de la alta variabilidad en cuanto al contenido en material particulado. Los coeficientes de partición son muy elevados con valores medios de  $3450 \pm 830 \text{ L} \cdot \text{Kg}^{-1}$ ,  $4751 \pm 1231 \text{ L} \cdot \text{Kg}^{-1}$ ,  $6575 \pm 1896 \text{ L} \cdot \text{Kg}^{-1}$  y  $12254 \pm 3803 \text{ L} \cdot \text{Kg}^{-1}$ , para el  $\text{C}_{10}\text{LAS}$ ,  $\text{C}_{11}\text{LAS}$ ,  $\text{C}_{12}\text{LAS}$  y  $\text{C}_{13}\text{LAS}$  respectivamente. En la figura 5.16 se muestra el incremento de la adsorción sobre los sólidos en suspensión al aumentar la longitud de la cadena alquílica para el conjunto total de muestras. La variación de la concentración para cada uno de los homólogos de LAS en los sólidos en suspensión es similar a la detectada en agua. En esta figura se puede apreciar un aumento de la adsorción de 2.5 a 3.2 veces por cada átomo de carbono adicional en la cadena alquílica, similar al detectado en ensayos de laboratorio por diversos autores (Games, 1982; Hand y Williams, 1987).

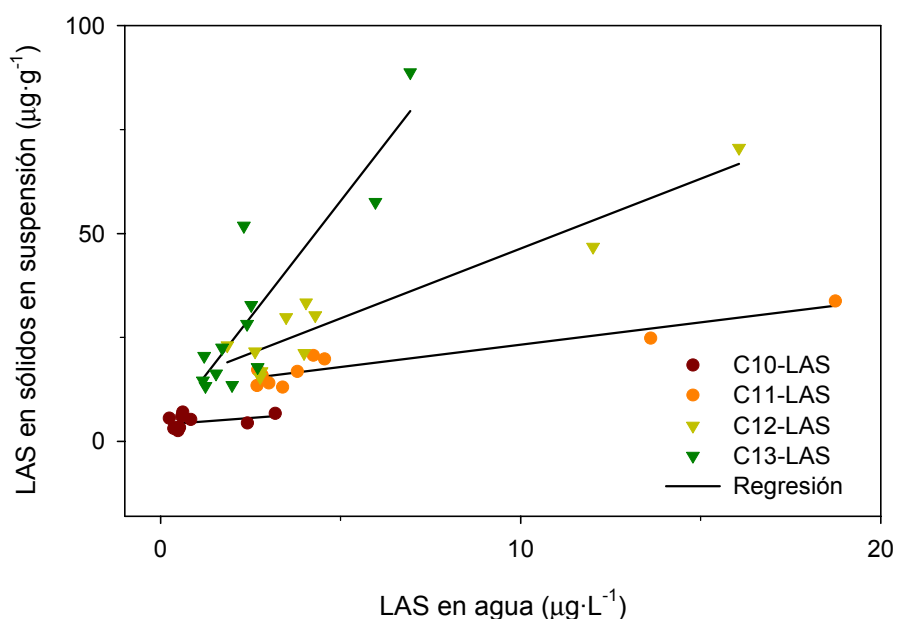


Figura 5.16. Representación de la concentración de LAS en sólidos en suspensión frente a la concentración en agua, para los muestreos realizados en la boca norte del caño de Sancti Petri.

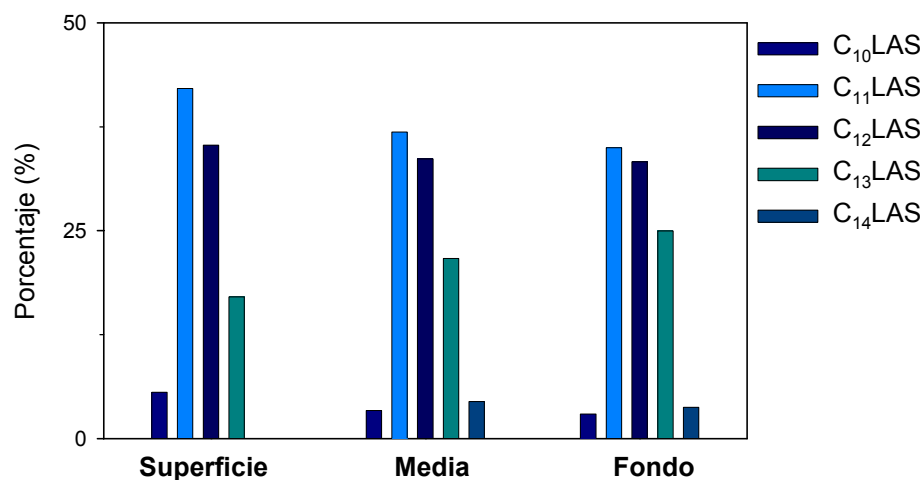
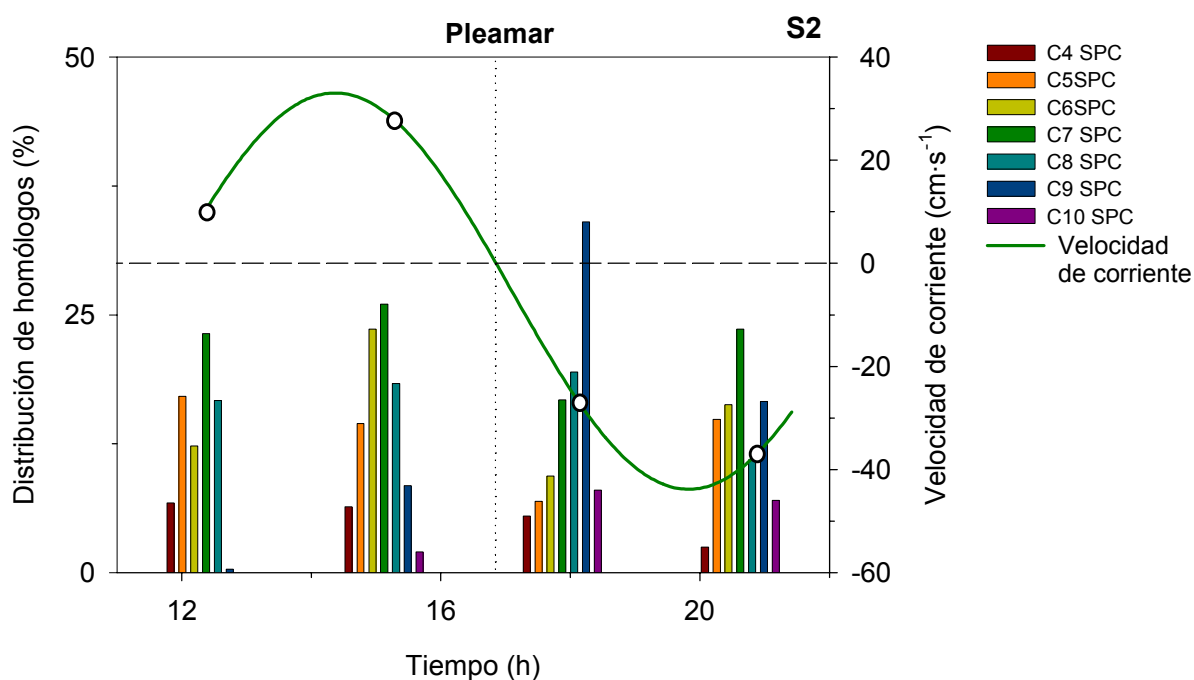


Figura 5.17. Distribución de los homólogos de LAS con la profundidad (superficie, media y fondo), expresada en porcentaje respecto al total, para un mismo tiempo durante el muestreo S2, realizado en La Carraca (boca norte del caño de Sancti Petri).

Durante el muestreo realizado con el mayor coeficiente de marea se ha observado en las muestras de la columna de agua un enriquecimiento de los homólogos de mayor peso molecular con la profundidad (Fig. 5.17). Este hecho está relacionado con el mayor contenido en sólidos en suspensión, al aumentar la profundidad como consecuencia de la

resuspensión del sedimento que generan las intensas corrientes existentes en estas condiciones.

La concentración media de SPC en agua es de  $11.0 \pm 6.3 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $18.9 \pm 11.8 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ , para los muestreos S1 y S2 respectivamente. La distribución de los homólogos de SPC a lo largo del ciclo de marea se muestra en la figura 5.18. La presencia de los homólogos de mayor peso molecular es más relevante durante la vaciante, que transporta la masa de agua de zonas más próximas al vertido. Sin embargo en otros momentos los que predominan son los SPC de longitud de cadena intermedia ( $\text{C}_5$ - $\text{C}_8$ SPC). En los sólidos en suspensión se han detectado los homólogos de SPC de 5 a 13 átomos de carbono, a concentraciones muy bajas. Los SPC de cadena más corta debido a su mayor polaridad tienden a estar disueltos, y por ello no han sido detectados en esta fase. Teniendo en cuenta el límite de detección del método no han podido ser cuantificados precisamente.



**Figura 5.18.** Distribución de los homólogos de los ácidos sulfofenilcarboxílicos, expresada en porcentaje respecto al total, para el muestreo S2 en distintos momentos del ciclo mareal (llenante y vaciante), y velocidad de corriente registrada a lo largo de dicho muestreo. Los círculos blancos indican exactamente el momento de la marea al que corresponde cada caso.

### 5.3.4. Estimación del flujo de LAS y SPC desde el caño de Sancti Petri hacia la Bahía de Cádiz

Los datos de velocidad de corriente y de la amplitud de marea obtenidos durante el muestreo, permiten determinar, mediante un modelo de cajas -una para cada profundidad analizada (superficie, media y fondo)- los flujos de LAS o SPC en cada caso. La sección total del caño se dividió en tres subsecciones, una superficial, correspondiente a la masa de agua situada por encima del nivel de la bajamar escorada y por tanto, variable con el tiempo (función de la onda de marea), y dos subsecciones (sección media y sección de fondo), establecidas por debajo de ese nivel con la misma área (fijas en el tiempo). La concentración de LAS y SPC se ha determinado para cada sección y cada instante de muestreo. Estos datos se utilizaron para estimar los flujos de estos compuestos a través de este canal como se expone a continuación.

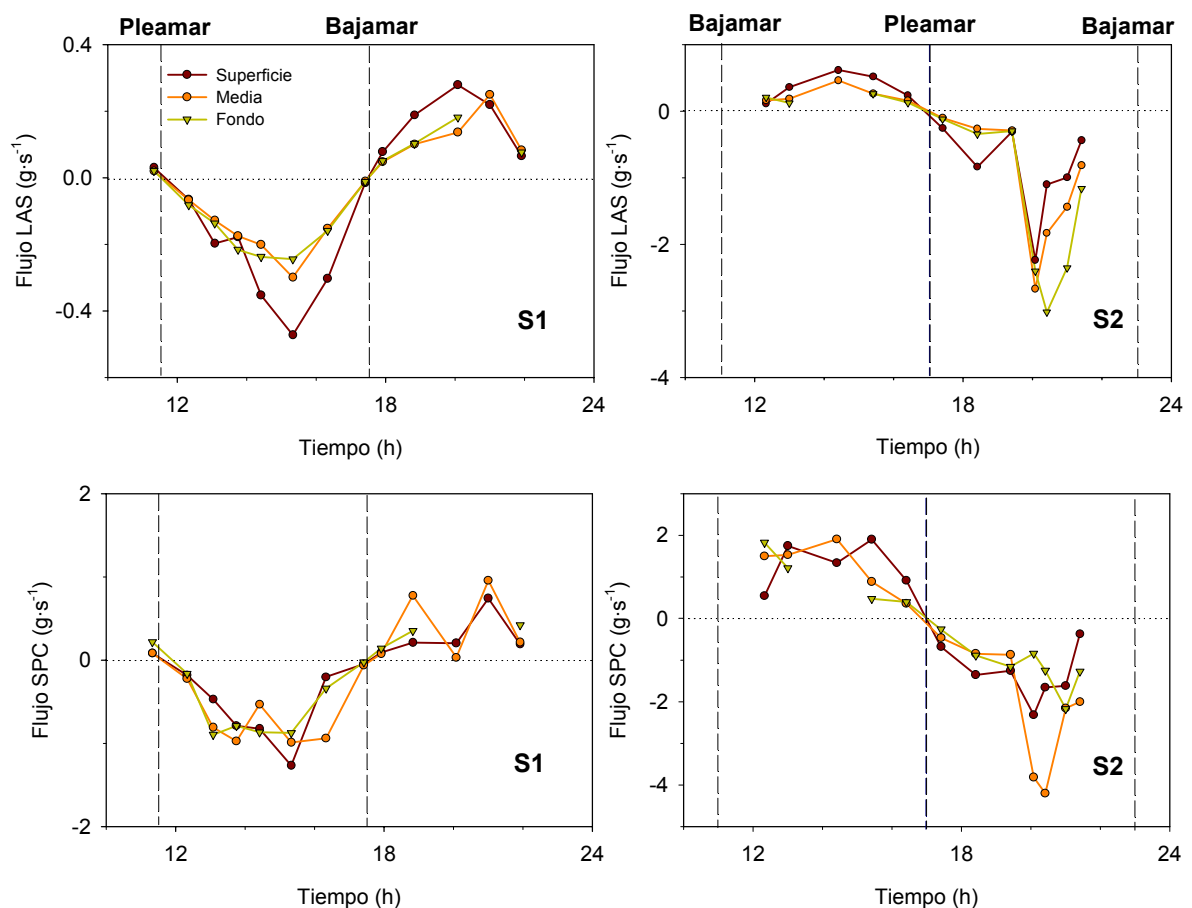
El cálculo del flujo de un compuesto C a través de una determinada sección (S) se ha realizado utilizando la siguiente expresión:

$$\text{Flujo}_C(\text{kg} \cdot \text{s}^{-1}) = V(\text{m} \cdot \text{s}^{-1}) \cdot S(\text{m}^2) \cdot [C](\text{kg} \cdot \text{m}^{-3})$$

donde V es la velocidad de corriente, S es el área de la sección del canal y [C] es la concentración del compuesto en estudio. El flujo se calcula para cada muestra, que representa el flujo de la sección correspondiente en ese momento. A continuación se representan los valores de flujo frente al tiempo, e integrando esta curva frente al tiempo nos permite obtener la masa total de compuesto que entra o sale en cada uno de los muestreos realizados.

La figura 5.19 muestra los flujos de LAS y SPC entre el caño de Sancti Petri y la bahía de Cádiz para las tres profundidades muestreadas (superficie, media y fondo) en los muestreos S1 y S2. Los coeficientes de marea son extremos y por tanto, la media del flujo es una buena estimación de la exportación-importación de LAS procedente del caño de Sancti Petri hacia la bahía de Cádiz. El sentido de flujo es positivo cuando se produce una entrada de LAS hacia el caño, y negativo cuando sale LAS desde el caño hacia la bahía. Los valores más elevados ( $3 \text{ g LAS} \cdot \text{s}^{-1}$ ) se obtuvieron en marea decreciente para el mayor coeficiente de marea (S2), como consecuencia del vertido del caño de Sancti Petri. En sentido inverso (flujo positivo) la cantidad de LAS que entra desde la bahía al caño durante la creciente es sensiblemente menor, y por tanto, se produce una exportación neta de LAS de  $-65.2 \text{ kg LAS d}^{-1}$ , hacia el saco interno de la bahía para el

mayor coeficiente de marea. La influencia del vertido en el caño es menor cuando el coeficiente de marea es pequeño y como consecuencia la exportación es también menor ( $-12.0 \text{ Kg LAS d}^{-1}$ ). El comportamiento es similar para los SPCs pero las diferencias son menos significativas. Considerando en su conjunto el valor medio de flujo neto de LAS y de los SPC se produce un aporte diario de unos  $38.6 \text{ kg}$  de LAS y de  $6.0 \text{ kg}$  de SPC hacia el saco interno de la bahía de Cádiz. El flujo de LAS ( $16 \text{ ton}\cdot\text{año}^{-1}$ ) es inferior al que recibe la bahía de Tokio ( $71 \text{ ton}\cdot\text{año}^{-1}$ ) procedente del río Tamagawa (Takada *et al.*, 1992a). Teniendo en cuenta la población aproximada de San Fernando ( $100000 \text{ hab.}$ ) y el consumo medio de LAS ( $5 \text{ g}\cdot\text{hab}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ), la masa de LAS que accede a la bahía de Cádiz representa sólo el 10% del total vertido. El resto de LAS ha sido previamente degradado o adsorbido a los sedimentos en la zona más cercana al punto de vertido.



**Figura 5.19.** Flujos de LAS detectados para las tres profundidades (superficie, media y fondo) entre el caño de Sancti Petri y el saco interno de la bahía de Cádiz, durante los muestreos S1 y S2.



### 5.3.5. Distribución del LAS y SPC en sedimentos marinos

La distribución de LAS y SPC se ha caracterizado también a lo largo de la columna sedimentaria en las tres estaciones (A, B y C) seleccionadas en el caño de Sancti Petri (Fig. 5.3b). Las concentraciones medias de LAS total y de SPC totales correspondientes a los primeros 8 cm de profundidad (equivalente a muestras tomadas con draga) se muestran en la tabla 5.10. La concentración de LAS en el sedimento superficial disminuye con la distancia al punto de vertido, debido a la continua eliminación del tensioactivo de la fase acuosa por biodegradación y adsorción sobre el material particulado. Estos resultados son similares a los obtenidos previamente por otros autores en zonas de características similares (Takada y Ogura, 1992; González-Mazo *et al.*, 1998).

**Tabla 5.10. Concentraciones de la capa superficial (0-8 cm profundidad) de LAS y SPC totales en sedimento, expresado como peso seco, y agua intersticial en las tres estaciones de muestreo.**

Estación	Sedimento		Agua intersticial	
	$\Sigma \text{LAS}^a$ $10^{-3} \cdot (\mu\text{g} \cdot \text{Kg}^{-1})$	$\Sigma \text{SPC}^b$ $(\mu\text{g} \cdot \text{Kg}^{-1})$	$\Sigma \text{LAS}^a$ $(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	$\Sigma \text{SPC}^b$ $(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$
B	$138.6 \pm 14.2$	$924.6 \pm 316.7$	$44.8 \pm 13.3$	$232.6 \pm 114.1$
C	$16.4 \pm 8.0$	$224.2 \pm 169.0$	$35.9 \pm 10.9$	$128.7 \pm 60.7$
A	$0.8 \pm 0.2$	$70.6 \pm 12.1$	$22.8 \pm 8.9$	$28.4 \pm 3.2$

$$^a \Sigma \text{LAS} = \sum_{i=10-14} (C_i - \text{LAS})$$

$$^b \Sigma \text{SPC} = \sum_{i=6-13} (C_i - \text{SPC})$$

La concentración de LAS en el sedimento superó en más de tres órdenes de magnitud a la detectada en el agua intersticial, y la concentración de SPC fue similar en ambas fases. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en los ensayos de adsorción y con los de otros autores (Rubio *et al.*, 1996; Hand y Williams, 1987; Westall *et al.*, 1999), así como con los observados en muestras tomadas de acuíferos contaminados por aguas residuales (Krueger *et al.*, 1998). Al aumentar el carácter polar disminuye la afinidad por el sedimento, de ahí que los SPC se encuentren distribuidos en ambas fases por igual.

La mayor concentración de LAS se ha detectado en la estación B, la más cercana al punto de vertido. En esta zona el agua sobrenadante presenta un elevado tiempo de

residencia (González-Mazo *et al.*, 1998), y como consecuencia se produce una extensa deposición del material particulado, al que el LAS se encuentra preferentemente asociado. El proceso de precipitación es especialmente relevante en esta zona, dada la alta concentración de LAS detectada en agua (González-Mazo *et al.*, 1998) y el bajo producto de solubilidad de su sal cálcica (Cohen *et al.*, 1993). Para las estaciones A y C, donde el contenido en sólidos en suspensión es menor, las diferencias detectadas se deben a las características de cada sedimento. El sedimento de la estación C presenta una mayor superficie específica por su mayor contenido en arcillas, y un mayor contenido en carbono orgánico como consecuencia de la mayor incidencia de la descarga de aguas residuales urbanas debido a la hidrodinámica de la zona (González-Mazo *et al.*, 1998). Ambos parámetros favorecen el proceso de adsorción de LAS (Matthijs y De Henau, 1985; Hand y Williams, 1987; Amano y Fukushima, 1993; Westall *et al.*, 1999) en la estación C con respecto a la A.

Así mismo la concentración de los homólogos de mayor peso molecular en sedimento disminuye con la distancia al punto de vertido (Tabla 5.11), ya que son los más fácilmente degradables y a su vez presentan una mayor tendencia a adsorberse sobre el

**Tabla 5.11. Distribución, expresada como porcentaje total de LAS, y coeficiente de partición medio normalizado por el contenido de carbono orgánico ( $K_{OC}$ ) de los homólogos de LAS en la capa superficial del sedimento (0-8 cm de profundidad) en las tres estaciones en estudio.**

	Estación	C <sub>10</sub> LAS	C <sub>11</sub> LAS	C <sub>12</sub> LAS	C <sub>13</sub> LAS	C <sub>14</sub> LAS
Sedimento	B	0.9 ± 0.1	12.7 ± 0.7	34.6 ± 0.6	50.5 ± 1.1	1.2 ± 0.1
(%)	C	1.6 ± 0.6	14.7 ± 3.5	30.7 ± 0.3	50.8 ± 5.7	2.2 ± 1.5
	A	5.9 ± 0.2	33.1 ± 1.2	34.5 ± 1.0	25.5 ± 2.1	1.0 ± 0.6
Agua int.	B	11.6 ± 1.8	41.7 ± 4.9	37.4 ± 5.7	9.2 ± 2.1	n.d. (*)
(%)	C	6.9 ± 1.5	31.1 ± 3.4	52.2 ± 4.1	9.7 ± 4.2	n.d.
	A	6.1 ± 1.0	26.9 ± 5.6	51.9 ± 7.6	15.1 ± 9.3	n.d.
$K_{OC} \times 10^{-3}$	B	8.7 ± 2.7	35.0 ± 10.9	103.6 ± 18.1	660.2 ± 173.5	-
(L/kg)	C	3.5 ± 1.5	7.4 ± 3.4	9.8 ± 4.6	11.3 ± 43.3	-
	A	2.4 ± 0.8	2.8 ± 1.2	3.4 ± 1.0	4.3 ± 2.3	-

(\*) n.d.: no detectado

sedimento (Rubio *et al.*, 1996). Así en la estación A, la más alejada del vertido, predominan los homólogos de LAS de menor peso molecular (Tabla 5.11). La presencia de C<sub>14</sub>LAS en el sedimento es significativa, así como su ausencia en el agua intersticial como consecuencia de su elevado carácter hidrófobo. En este contexto, se aprecia que el coeficiente de partición normalizado por el contenido en carbono orgánico ( $K_{OC}$ ) de los homólogos del LAS (Tabla 5.11) aumenta con la longitud de la cadena, para las tres estaciones. El aumento es más significativo se ha observado en la estación B, donde accede el LAS con una mayor proporción de los homólogos más hidrofóbicos, para los que el producto de solubilidad como sal cálcica es menor (Cohen *et al.*, 1993).

En el sedimento predominan los SPC de cadena carboxílica larga (C<sub>8</sub> a C<sub>10</sub>SPC), especialmente en la estación B. En esta estación también se han detectado SPC de 12 y 13 átomos de carbono, lo que confirma que la degradación del LAS se inicia con una  $\omega$ -oxidación del metilo terminal. En el agua intersticial los que se han detectado en mayor proporción son el C<sub>8</sub>SPC y el C<sub>9</sub>SPC.

En la figura 5.20 se muestran los perfiles verticales de las concentraciones de los homólogos de LAS en el sedimento y en el agua intersticial. Excepto para la estación A, donde la concentración de LAS fue pequeña en ambas fases, se ha observado un claro descenso de la concentración con la profundidad. El descenso es más acusado para el sedimento y se produce especialmente en los primeros centímetros, probablemente por el aumento de las descargas del efluente en los últimos años en la zona. En la estación B, la concentración máxima de LAS no se detectó en la capa superficial sino a pocos centímetros de profundidad (Fig. 5.20b), como consecuencia de los procesos de mezcla física que alteran los primeros milímetros del sedimento (Amano *et al.*, 1992).

En las estaciones B y C la variación en la concentración total de LAS con la profundidad estuvo determinada principalmente por los homólogos de 12 y 13 átomos de carbono (Fig. 5.20), que presentan la mayor capacidad de adsorción y son fácilmente degradables. El perfil vertical de la concentración de LAS en el agua intersticial es similar al observado para los sedimentos, especialmente en las estaciones B y C. De los resultados se desprende que el coeficiente de partición para los distintos homólogos no varía con la profundidad del sedimento, teniendo en cuenta su homogénea composición en términos de porosidad y de contenido en carbono orgánico.

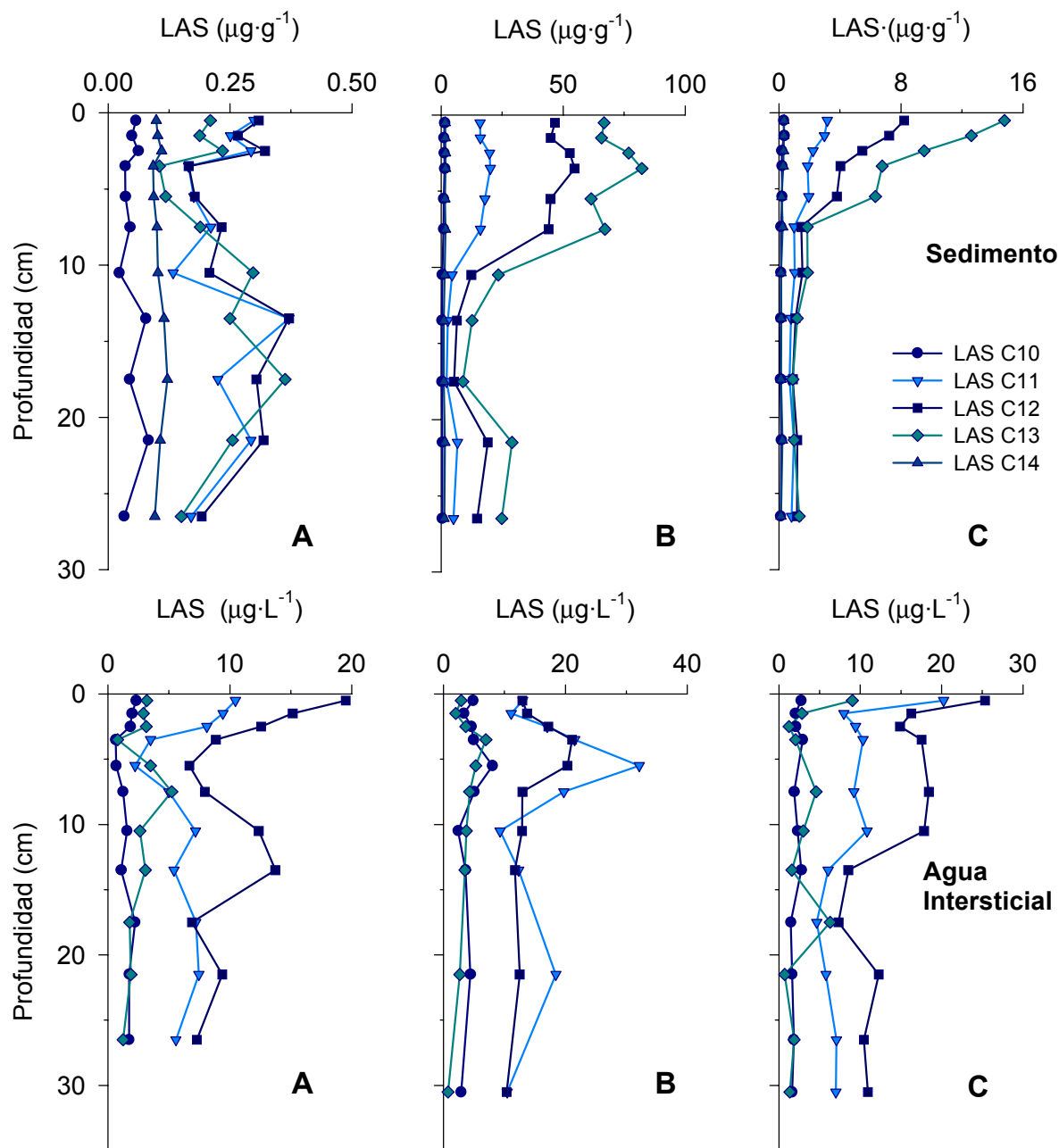
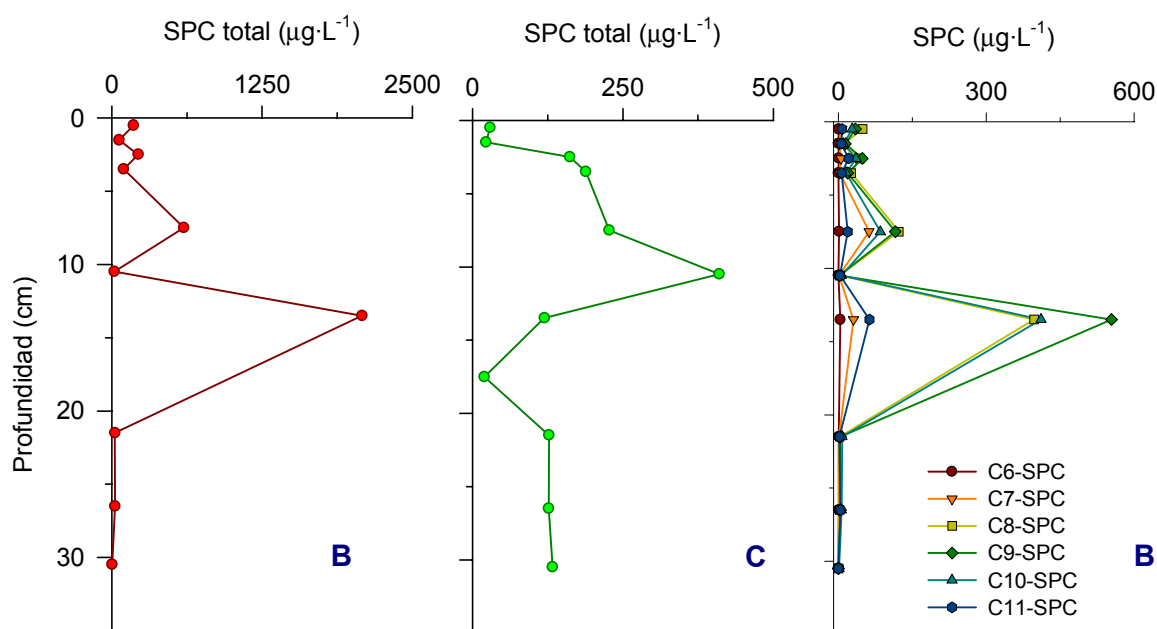


Figura 5.20. Perfiles verticales de distribución de los homólogos de LAS en sedimentos de tres estaciones con distinto grado de exposición al vertido de agua residuales de San Fernando (Cádiz).

El acusado descenso en la concentración de LAS con la profundidad, sobre todo en las estaciones más próximas al punto de vertido de las aguas residuales, puede deberse a dos factores principalmente : i) al aumento la cantidad de LAS descargada en las últimas décadas, bien por el incremento de la población o del consumo per capita de LAS; e ii) a la degradación del LAS en el sedimento. La primera de estas dos hipótesis es cierta, la población de San Fernando ha aumentado en un 40% en los últimos 20 años (1975-1995), pero el consumo de LAS por habitante no ha variado significativamente en España durante este periodo. Sin embargo es necesario verificar también la segunda posibilidad. Para ello se caracterizó la variación de la concentración de SPC con la profundidad, cuyos resultados para las estaciones B y C se muestran en la figura 5.21. El perfil vertical obtenido para el total de los SPC (entre 6 y 13 átomos de carbono) presenta un máximo a profundidades entre 10 y 14 cm, que para la estación B llega hasta un valor de  $2100 \mu\text{g L}^{-1}$ . Si se tiene en cuenta que en ausencia de una alternativa física o biológica (bioturbación) del sedimento, la difusión es el único mecanismo de transporte involucrado en el transporte de solutos en el agua intersticial (Forja *et al.*, 1994), la existencia a una profundidad de 10-14 cm de concentraciones de SPC superiores a las encontradas en la interfase sedimento-agua, induce a pensar que esos productos han sido generados en ese lugar, donde las condiciones son anóxicas ( $E_h = -380\text{mV}$ ).



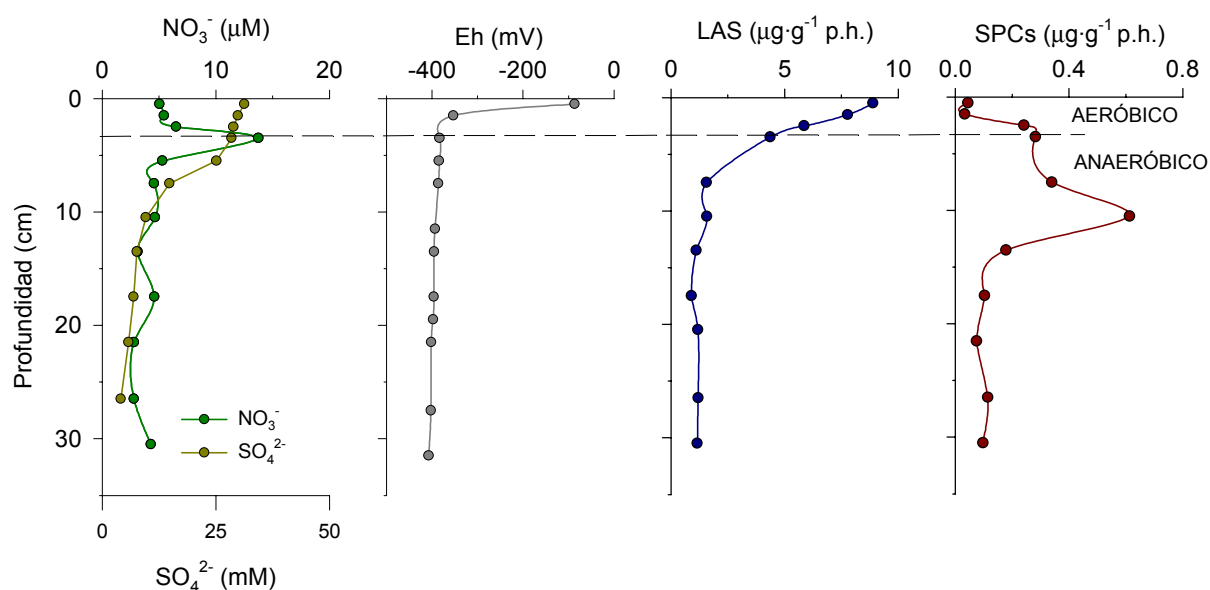
**Figura 5.21.** Distribución de la concentración total de SPC -suma de todos los homólogos- en el agua intersticial a lo largo de la columna sedimentaria en las estaciones B y C, y perfil vertical de los homólogos de SPC detectados en el agua intersticial de la estación B.

La distribución de los SPC medidos está determinada principalmente por los homólogos C<sub>8</sub>-C<sub>11</sub> (estación B, Figura 5.21). Aunque la presencia de los SPC de cadena corta (C<5) no ha sido determinada, es probable que estos intermedios puedan constituir también una parte relevante de los metabolitos del LAS en el agua intersticial. La reducción en la concentración de los homólogos de SPC detectada por encima y por debajo del máximo (10-14cm) sugiere que después de su producción, los SPC se transforman en otros de cadena carboxílica más corta, probablemente por sucesivas  $\beta$ -oxidaciones (Huddleston y Allred, 1963; Swisher, 1987). Los SPC con una cadena carboxílica de menos de 6 átomos de carbono se han detectado tanto en el sedimento como en el agua intersticial también a concentraciones significativas. Nosotros sugerimos que los SPC de cadena larga se producen en las etapas iniciales de degradación de LAS, y esto se produce a una considerable profundidad (10-14 cm). Este resultado sugiere que la tasa de degradación de los SPC bajo condiciones anóxicas debe ser muy lenta. Desafortunadamente los testigos de sedimento no fueron datados, aunque los datos disponibles de la tasa de sedimentación en partes cercanas a la zona de estudio (menos de 5 km de distancia) permiten calcular que el material situado a 10-14 cm de profundidad se depositó hace unos 15-22 años.

En la figura 5.22, se muestra la concentración total de LAS y los SPC de mayor peso molecular (sedimento húmedo: sedimento + agua intersticial) junto con los perfiles verticales de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> en el agua intersticial. En la zona óxica, cuyo límite inferior ( $\approx$  3 cm) se puede estimar a partir del máximo de concentración del NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Smethie, 1987), se observa una disminución acusada de la concentración de LAS con la profundidad. La oxidación aerobia puede contribuir a esta distribución. Las bajas concentraciones de SPC en esta zona indican que las sucesivas  $\beta$ -oxidaciones se producen con rapidez en condiciones óxicas (Swisher, 1987).

A mayores profundidades, donde se produce un aumento en el gradiente vertical de la concentración de SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, el sulfato sirve como aceptor terminal de electrones en la degradación de la materia orgánica (Gómez-Parra y Forja, 1993). En cualquier caso, a esta profundidad (4-8 cm), los gradientes verticales de la concentración de LAS y SPC de mayor peso molecular no son tan acusados. Esta observación es coincidente con la opinión expresada por Klump y Martens (1987), que expusieron que el efecto de la reducción del sulfato no es una ruta metabólica eficiente para la degradación de moléculas orgánicas complejas. La concentración máxima de los SPC de longitud de

cadena larga se detectaron a 10-14 cm donde la concentración de sulfato fue muy baja (<10 mM) y disminuye suavemente con la profundidad. Otros mecanismos anaeróbicos de la descomposición de la material orgánica pueden estar involucrados en la degradación del LAS, y es necesario un estudio más profundo para caracterizar este proceso en condiciones anaeróbicas, en caso de que se produzca.



**Figura 5.22. Perfiles verticales de la concentración de nitrato, sulfato en agua intersticial, pH y concentraciones de LAS y SPC totales en sedimento (peso húmedo) para la estación C.**

La concentración máxima de SPC de cadena larga se ha encontrado a la profundidad a la que la sulfato reducción no es efectiva (49), debido al agotamiento del sulfato o a la reducción de su concentración. Así se puede concluir que la metanogénesis debe ser la ruta implicada en la degradación primaria del LAS. Para confirmar esta evidencia de la degradación del LAS en sedimentos anóxicos es necesario continuar la investigación y realizar ensayos de degradación anaeróbica.

## 5.4. BIBLIOGRAFÍA

- Amano, K., Fukushima, T., Inaba, K., Nakasugi, O. 1989. Adsorption of LAS with the suspended solids in natural aquatic systems. *Jap. J. Wat. Poll. Res.*, 12, 8: 38-47.
- Amano, K., Fukushima, T., Nakasugi, O. 1991. Fate of linear alkylbenzenesulfonates in a lake estuary. *Wat. Sci. Technol.*, 23: 497-506.
- Amano, K.; Fukushima, T., Nakasugi, O. 1992. Diffusive exchange of linear alkylbenzenesulfonates (LAS) between overlying water and bottom sediment. *Hydrobiologia*, 235/236: 491-499.
- Amano, K., Fukushima, T. 1993. Paritioning of linear alkylbenzenesulfonates in natural water and sediment. *J. Environ. Sci. Health*, 28, 3:683-696.
- Angelidaki, I., Haagensen, F., Ahring, B.K. 2000. Anaerobic transformation of LAS in continuous stirred tank reactors treating sewage sludge. The Cler Review- Research Technology Public Policy, 6, 1:32-38.
- Berna, J. L., Ferrer, J., Moreno, A., Prats, D., Ruiz Bevia, F. 1989. The fate of LAS in the environment. *Tenside Surfact. Det.*, 26, 2:101-107.
- Cavalli, L., Gellera, A., Landone, A. 1993. LAS removal and biodegradation in a wastewater treatment plant. *Environ. Toxicol. Chem.*, 12: 1777-1788.
- Cavalli, L., Cassani, G., Vigano, L., Pravettoni, S., Nucci, G., Lazzarin, M., Zatta, A. 2000. Surfactants in sediments. *Tenside Surfact. Det.*, 37, 5:282-288.
- Cohen, L., Moreno, A., Berna, L. 1993. Influence of calcium concentration in the washing liquor on detergency performance of linear alkylbenzene sulfonate. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 70, 1:79-82.
- Cohen, J.E., Small, C., Mellinger, A, Gallup, J., Sachs, J. 1997. Estimates of coastal populations. *Science*, 278: 1211-1212.
- Del Valls, T.A., Forja, J.M., Gómez-Parra, A. 1998. Integrative assessment of sediment quality in two littoral ecosystems from the Gulf of Cádiz, Spain. *Environ. Toxicol. Chem.*, 17, 6:1073-1084..
- Di Corcia, A.; Capuani, L.; Casassa, F.; Marcomini, A., Samperi, R. 1999. Fate of linear alkyl benzenesulfonates, coproducts, and their metabolites in sewage treatment plants and in receiving river waters. *Environ. Sci. Technol.*, 33, 22: 4119-4125.
- Ding, W. H.; Tzing, S. H., Lo, J. H. 1999. Occurrence and concentrations of aromatic surfactants and their degradation products in river waters of Taiwan. *Chemosphere*, 38, 11: 2597-2606.
- Federle, T. W., Schwab, B. S. 1992. Mineralization of surfactants in anaerobic sediments of a laundromat wastewater pond. *Wat. Res.*, 26, 1:123-127.



- Feitjel, T.C.J., Matthijs, E., Rottiers, A., Rijs, G.B.J., Kiewit, A. de Nijs, A. 1994. AIS/CESIO Environmental Surfactant Monitoring Programme. Part 1: LAS monitoring study in "de Meern" sewage treatment plant and receiving river "Leidsche Rijn". *Chemosphere*, 30, 6:1053-1066.
- Feitjel, T., Vits, H., Murray-Smith, R., van Wijk, R., Schröder, R., Birch, R., Ten Berge, W. 1996. Fate of LAS in activated sludge wastewater treatment plants: a model verification study. *Chemosphere*, 32, 7:1413-1426.
- Ferrer, J., Moreno, A., Vaquero, M. T., Comellas, L. 1997. Monitoring of LAS in direct discharge situations. *Tenside Surfact. Det.*, 34, 4:278-282.
- Field, J. A., Leenheer, J. A., Thorn, K. A., Barber, L. Jr., Rostad, C., Macalady, D. L., Daniel, S. R. 1992. Identification of persistent anionic surfactant-derived chemicals in sewage effluent and groundwater. *J. Contam. Hydrol.*, 9: 55-78.
- Field, J. A., Field, T. M., Poiger, T., Giger, W. 1994. Determination of secondary alkane sulfonates in sewage wastewaters by solid-phase extraction and injection-port derivatization gas chromatography/mass spectrometry. *Environ. Sci. Technol.*, 28, 3:497-503.
- Forja, J.M., Blasco J., Gómez-Parra, A. 1994. Spatial and seasonal variation of "in situ" benthic fluxes in the Bay of Cádiz (SW Spain). *Estuar. Coastal Shelf Sci.*, 39,127-141.
- Games, L. M. 1982. Field validation of exposure analysis modelling system (EXAMS) in a flowing stream. En 'Modelling the Fate or Chemicals en the Aquatic Environment'. 4th Meeting 1981. Ed Dickson K. L., Maki, A. W. y Cairns, J. Ann. Arbor. Sci. Ann Arbor Michigan, USA. 325-346.
- Giger, W., Brunner, P.H., Ahel, M., McEvoy, J., Marcomini, A., Schaffner, C. 1987 Organic detergent components and their degradation products in waste water and sludge. *Gas Wasser Abwasser*, 67: 111-122.
- Gledhill, W. E.; Trehy, M. L., Carson, D. B. 1991. Comparative biodegradability of anionic surfactants in synthetic and natural test systems. *Chemosphere*, 22, 9-10: 873-880.
- Gómez-Parra, A., Forja, J.M. 1993. Benthic nutrient fluxes in Cadiz Bay (SW Spain). *Hydrobiologia* 252: 23-24.
- González-Mazo, E., Gómez-Parra, A. 1996. Monitoring anionic surfactants (LAS) and their intermediate degradation products in the marine environment. *Trends Anal. Chem.*, 15, 8: 375-380.
- González-Mazo, E.; Honing, M.; Barceló, D., Gómez-Parra, A. 1997. Monitoring long-chain intermediate products from the degradation of linear alkylbenzene sulfonates in the marine environment by solid-phase extraction followed by liquid chromatography/iospray mass spectrometry. *Environ. Sci. Technol.*, 31, 2: 504-510.
- González-Mazo, E.; Forja, J. M., Gómez-Parra, A. 1998. Fate and distribution of linear alkylbenzene sulfonates in the littoral environment. *Environ. Sci. Technol.*, 32, 11: 1636-1641.

- González-Mazo, E., Quiroga, J. M., Gómez-Parra, A. 1999. Linear alkylbenzene sulfonates (LAS) as tracers of urban waste waters in shallow littoral ecosystems: a case of study the bay of Cadiz. *Ciencias Marinas*, 25,2: 367-379.
- Hand, V. C., Williams, G. K. 1987. Structure-activity relationships for sorption of linear alkylbenzenesulfonates. *Environ. Sci. Technol.*, 21, 4:370-373.
- Holt, M. S., Waters, J., Comber, M. H. I., Armitage, R., Morris, G., and Newbery, C. 1995. AIS/CESIO Environmental Surfactant Monitoring Programme. SDIA sewage treatment pilot study on linear alkylbenzene sulphonate (LAS) . *Wat. Res.*, 29, 9:2063-2070.
- Holt, M. S., Fox, K. K., Burford, M., Daniel, M., Buckland, H. 1998. UK monitoring study on the removal of linear alkylbenzene sulphonate in trickling filter type sewage treatment plants. Contribution to GREAT-ER project#2. *Sci. Total Environ.*, 210/211: 255-269.
- Hon-nami, H., Hanya, T. 1980. LAS in river, estuary and bay water. *Wat. Res.*, 41: 1251-1256.
- Huddleston, R.L., Allred, R.C. 1963. Microbial oxidation of sulfonated alkylbenzenes. *Dev Ind Microbial* 4: 24-38.
- Kilikidis, S., Kamarianos, A., Karamanlis, X., Giannakou, U. 1994. Concentrations of LAS in the municipal waste water of the city of Thessaloniki and the seawater of the receiver gulf of Thessaloniki (N. Greece). *Fresenius Envir Bull.*, 3: 95-100.
- Klump, J.V., Martens, C.S. 1987. Biogeochemical cycling in an organic-rich coastal marine basin. 5. Sedimentary nitrogen and phosphorus budgets based upon kinetic models, mass balances, and the stoichiometry of nutrient regeneration. *Geochim. Cosmochim. Acta.*, 51: 1161-1173.
- Knepper, T.P., Kruse, M. 2000. Investigations into the formation of sulfophenylcarboxylates (SPC) from linear alkylbenzenesulfonates (LAS) by liquid chromatography/mass spectrometry. *Tenside Surfact. Det.*, 37:41-47.
- Krueger, C. J., Barber, L. B., Metge, D. W., and Field, J. A. 1998. Fate and transport of linear alkylbenzenesulfonate in a sewage-contaminated aquifer: a comparison of natural-gradient pulsed tracer tests. *Environ. Sci. Technol.*, 32, 8:1134-1142.
- Lillebaelt report (1998), The Lillebaelt Cooperation, Denmark, December 1998.
- Larson, R. J., Rothgeb, T. M., Shimp, R. J., Ward, T. E., Ventullo, R.M. 1993. Kinetics and practical significance of biodegradation of LAS in the environment. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 70, 7:645-657.
- Marcomini, A., Pjana, G., Sfriso, A., Quiroga, J.M. 2000. Behavior of anionic and anionic surfactants and their persistent metabolites in the Venice Lagoon, Italy. *Environ. Toxicol. Chem.*, 19, 8, 2000-2007.
- Matthijs, E., De Henau, H. 1985. Adsorption and desorption of LAS. *Tenside Det.*, 22, 6:299-342.

- Matthijs, E., De Henau, H. 1987. Determination of linear alkylbenzenesulfonates in aqueous samples sediments, sludges and soils using HPLC. *Tenside Surfact. Det.*, 24, 4:193-198.
- Matthijs, E., Stalmans, M. 1993. Monitoring of LAS in the North Sea. *Tenside Surfact. Det.*, 30, 1:29-33.
- McAvoy, D. C., Eckhoff, W. S., and Rapaport, R. A. 1993. Fate of linear alkylbenzene sulfonate in the environment. *Environ. Toxicol. Chem.*, 12: 977-987.
- McAvoy, D. C., Dyer, S. D., Fendinger, N. J., Eckhoff, W. S., Lawrence, D. L., Begley, W. M. 1998. Removal of alcohol ethoxylaes, alkyl ethoxylate sulfates, and linear alkylbenzene sulfonates in wate water treatment. *Environ. Toxicol. Chem.*, 17, 9:1705-1711.
- Moreno Danvila . 1987. Toxicity of LAS and other surfactants during biodegradation in natural and artificial media. Presentación privada. Petroquímica Española SA, Madrid, España.
- Moreno, A., Ferrer, J., Berna, J. L. 1990. Biodegradability of LAS in a sewer system. *Tenside Surfact. Det.*, 27, 5:312-315.
- Painter, H. A., Zabel, T. 1989. The behaviour of LAS in sewage treatment. *Tenside Surfact. Det.*, 26, 2:108-115.
- Prats, D., Ruiz, F., Vázquez, B., Zarzo, D., Berna, J. L., Moreno, A. 1993. LAS homolog distribution shift during wastewater treatment and composting: ecological implications. *Environ. Toxicol. Chem.*, 12: 1599-1608.
- Prats, D., Ruiz, F., Vázquez, B., Rodríguez-Pastor, M. 1997. Removal of anionic and nonionic surfactants in a wastewater treatment plant with anaerobic digestion. A comparative study. *Wat. Res.*, 31, 8:1925-1930.
- Prats, D., Rodríguez, M, Llamas, J.M., De la Muela, M.A., Ferrer, J., Moreno, A., Berna, J.L. 2000. The use of specific analytical methods to assess the anaerobic biodegradation of LAS. The Cler Review, Research Technology Public Policy, 6,1: 46-53.
- Quiroga Alonso, J. M., Sales Márquez, D., Gómez Parra, A. 1989. Experimental evaluation of pollution potential of anionic surfactants in the marine environment. *Wat. Res.*, 23, 7:801-807.
- Rapaport, R.A., Eckhoff, W.S. 1990. Monitoring linear alkylbenzene sulfonate in the environment 1973-1986. *Environ. Toxicol. Chem.*, 9:1245-1257.
- Reiser, R., Toljander, H., Albrecht, A., Giger, W. 1997. Alkylbenzenesulfonates in recent lake sediments as molecular markers for the environmental behavior of detergent-derived chemicals. American Chemical Society SYMPOSIUM SERIES 671, Molecular Markers in Environmental Geochemistry, R.P. Eganhouse, Editor; 196-212.
- Romano, P., Ranzani, M. 1992. Anionic surfactants removal and biodegradation in a large treatment plant. *Wat. Sci. Tech.*, 26, 9-11:2547-2550.

- Rubio, J. A.; González-Mazo, E., Gómez-Parra, A. Sorption of LAS on marine sediment. *Mar. Chem.*, 1996; 54: 171-177.
- Sánchez Leal, J., García, M. T., Tomás, R., Ferrer, J., Bengoechea, C. 1994. LAS removal. *Tenside Surfact. Det.*, 31, 4:253-256.
- Schöberl, P. 1989. Basic principles of LAS biodegradation. *Tenside Surfact. Det.*, 1989; 26, 2: 86-94.
- Schöberl, P., Klotz, H., Spilker, R. 1996. LAS- monitoring. Teil 3: LAS-Gehalte der Schwebstoffe verschiedener deutscher Fließgewässer. *Tenside Surfact. Det.*, 33, 4:329-335.
- Schöberl, P. Spilker, R. 1996. LAS-konzentrationen im Lippe-sediment eines Rhein-Altarmes. *Tenside Surfact. Det.*, 33, 5:400-403.
- Schöberl, P. 1997. Linear alkylbenzenesulphonate (LAS) monitoring in Germany. *Tenside Surfact. Det.*, 34, 4:233-237.
- Schröder, F. R. Concentrations of anionic surfactants in receiving riverine water. Results of a long-term monitoring programme in the river Rur. *Tenside Surfact. Det.*, 1995; 32, 6: 492-497.
- Schröder, F.R., Schmitt, M., Reichensperger, U. 1999. Effect of waste water treatment technology on the elimination of anionic surfactants. *Waste Manag.*, 19: 125-131.
- Scott, M.J., Jones, M.N. 2000. The biodegradation of surfactants in the environment. *Biochim. Biophys. acta*, 1508:235-251.
- Smethie WM. 1987. Nutrient regeneration and denitrification in low oxygen fjords. *Deep-Sea Res* 34: 983-1006.
- Solbé, J., Berna, J.L., Cavalli, L., Feiftel, T.J., Fox, K.K., Heinze, J., Marshall, S.J., de Wolf, W. 2000. Terrestrial risk assessment of linear alkyl benzene sulphonate in sludge-amended soils. *Proceedings of 5<sup>th</sup> World Surfactant Congress*, 2: 1433-1438.
- Stalmans, M., Matthijs, E., de Oude, N.T. 1991. Fate and effect of detergent chemicals in the marine and estuarine environment. *Wat. Sci. Technol.*, 24: 115.
- Swisher, R. D. 1987. Surfactant biodegradation. Chemical structure and primary biodegradation. *Surfactant Science Series*. Marcel Dekker Publ., New York. Vol. 18, 415-445.
- Tabor, C. F., Barber, L. B. 1996. Fate of linear alkylbenzene sulfonate in the Mississippi River. *Environ. Sci. Technol.*, 30, 1:161-171.
- Takada, H., Ishiwatari, R. 1987. LABS in urban riverine environments in Tokyo: distribution, source and behavior. *Environ. Sci. Technol.*, 21, 9:875-883.
- Takada, H., Ishiwatari, R. 1991. LABS in urban riverine and coastal sediments and their usefulness as a molecular indicator of domestic wastes. *Wat. Sci. Tech.*, 25, 437-446.

- Takada, H., Ogura N., Ishiwatari, R. 1992a. Seasonal variations and modes of riverine input of organic pollutants to the coastal zone:1.Flux of detergent-derived pollutants to Tokyo Bay. *Environ. Sci. Technol.*, 26, 12: 2517-2523.
- Takada, H., Ishiwatari, R., Ogura, N. 1992b. Distribution of linear alkylbenzenes (LABs) and linear alkylbenzenesulphonates (LAS) in Tokyo Bay sediments. *Estuar. Coastal Shelf Sci.*, 35: 141-156.
- Takada, H. Ogura, N. 1992. Removal of linear alkylbenzenesulfonates (LAS) in the Tamagawa Estuary. *Mar. Chem.*, 37, 257-273.
- Takada, H., Mutoh, K., Tomita, N., Miyadzu, T., Ogura, N. 1994. Rapid removal of LAS by attached biofilm in an urban shallow stream. *Wat. Res.*, 28, 9:1953-1960.
- Taylor, P.W., Nickless, G. 1979. Paired-ion high-performance liquid chromatography of partially biodegraded linear alkylbenzenesulphonate, *J. Chromatogr.*, 179: 259-269.
- Taylor, P.W., Nickless, G. 1987. *J. Chromatogr.*, 403, 243.
- Terzic, S., Hrsak, D., Ahel, M. 1992. Primary biodegradation kinetics of LAS in estuarine waters. *Wat. Res.*, 26, 5:585-591.
- Terzic, S., Ahel, M. 1994. Input and behaviour of linear alkylbenzenesulphonates (LAS) in a stratified estuary. *Mar. Pollut. Bull.*, 28,12,735-740.
- Trehy, M. L., Gledhill, W. E., Orth, G. 1990. Determination of LAS and dialkyltetralinsulfonates in water and sediment by GC/MS. *Anal. Chem.*, 62:2581-2586.
- Westall, J. C., Chen, H., Zhang, W., Brownawell, B. J. 1999. Sorption of linear alkylbenzenesulfonates on sediment materials. *Environ. Sci. Technol.*, 33, 18:3110-3118.

## **6. CONCLUSIONES**

## 6. CONCLUSIONES

1. Se propone el primer procedimiento analítico para la determinación cuantitativa y simultánea del alquilbenceno lineal sulfonato ( $C_{10-14}$  LAS) y sus intermedios de degradación –los ácidos sulfofenilmonocarboxílicos ( $C_{4-13}$  SPC), en agua, sólidos en suspensión, sedimento y agua intersticial de sistemas estuáricos y marinos. El método, basado en la extracción en fase sólida seguida por cromatografía de líquidos con detector de fluorescencia, permite la cuantificación de estos compuestos de forma precisa, en un amplio intervalo de concentraciones y salinidades, con un límite de detección inferior a  $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ .
2. Se ha constatado que la degradación primaria del LAS a concentraciones ambientales (hasta  $2\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) supera el 98% en todas las condiciones ensayadas de temperatura, longitud de cadena de homólogo y en presencia o ausencia de una flora bacteriana adaptada a la contaminación de origen urbano. La velocidad de la degradación primaria del LAS aumenta con la temperatura y con la adición de un inóculo. Para los homólogos estudiados ( $C_{11}\text{LAS}$  y  $C_{12}\text{LAS}$ ) no se aprecian diferencias en la cinética del proceso cuando la velocidad de la degradación se establece con esos compuestos por separado. En las condiciones experimentales utilizadas, la ecuación cinética de biodegradación tiene un orden complejo, que denota una fase de aclimatación microbiana al sustrato, un periodo de desaparición exponencial del LAS y una última etapa en la que, al reducirse su concentración, la velocidad de degradación es muy pequeña. Si no se considera la fase inicial de aclimatación, los resultados obtenidos se indican que el proceso de biodegradación primaria sigue básicamente una cinética de primer orden.
3. Durante la biodegradación del LAS se ha detectado la presencia, como intermedios de degradación, de ácidos sulfofenilcarboxílicos de longitud de cadena entre 3 y 10 átomos de carbono. Las concentraciones relativas de estos compuestos, así como su evolución temporal, permiten concluir que el mecanismo de degradación más eficiente es la  $\beta$ -oxidación de la cadena alquílica. La  $\omega$ -oxidación, que constituye el primer paso del mecanismo con el que se produce la biodegradación del LAS, conduce a unos intermedios de una elevada reactividad, ya que no se han detectado en ningún instante de los ensayos de biodegradación

ácidos sulfofenilcarboxílicos de igual longitud de cadena que el LAS inicial. La acumulación y persistencia de los ácidos sulfofenilcarboxílicos de longitud de cadena intermedia ( $C_{5-7}$ SPC) a lo largo de los ensayos, indica que su degradación constituye la etapa limitante del proceso de biodegradación del LAS.

4. La adsorción de los homólogos de LAS y SPC entre 10 y 13 átomos de carbono sobre sedimentos marinos muestra una clara dependencia con la polaridad del compuesto. El LAS, como consecuencia de su carácter hidrófobo, muestra una gran afinidad por el sedimento y su adsorción aumenta con la longitud de la cadena alquílica. Este proceso es, en parte reversible, ya que la desorción afecta del 30 al 50% del LAS adsorbido, dependiendo de la longitud de la cadena alquílica. Los SPC presentan una capacidad de adsorción mucho menor y se distribuyen equitativamente entre la fase sólida y la disuelta, y se ha observado un ligero aumento en su adsorción al aumentar la longitud de la cadena carboxílica. Para estos compuestos la adsorción es reversible, lo que denota la débil interacción que se establece con el sedimento.
5. A concentraciones ambientales y a las temperaturas estudiadas (5, 10, 15, 20 y 25°C), la adsorción de  $C_{11}$ LAS se ajusta a una isoterma de “dos centros” que contempla la existencia inevitable de la adsorción sobre la superficie de los recipientes en los que se realizan los experimentos de adsorción en el laboratorio. La cuantificación de este artefacto permite obtener una información sobre la adsorción que es extrapolable a la que tiene lugar en la naturaleza. Para los SPC se ha encontrado que su capacidad de adsorción es muy reducida. La adsorción del LAS sobre el sedimento disminuye ligeramente con la temperatura, especialmente para concentraciones inferiores a  $200 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Los valores de las propiedades termodinámicas estudiadas permiten incluir el proceso dentro de la quimisorción.
6. En los distintos sistemas costeros estudiados, que están sujetos a un fuerte gradiente de salinidad, el LAS muestra un comportamiento no conservativo, que está provocado por su biodegradación y su capacidad de adsorción. Se ha encontrado una gran variabilidad espacial y temporal en su concentración, que está motivada por la proximidad de los lugares de vertido de efluentes residuales urbanos, por las características hidrodinámicas de la zona y por las propiedades tensioactivas de este compuesto. Esta última característica, que es común a todas



las sustancias que presenta una concentración superficial en exceso, obliga a considerar de manera especial la toma de muestra previa a su análisis, tanto en el medio natural como en los ensayos realizados en el laboratorio. A diferencia del compuesto del que proceden, los SPC muestran una distribución homogénea en la columna de agua.

7. Se han detectado en los ecosistemas estudiados SPC de longitud de cadena carboxílica entre 3 y 13 átomos de carbono. Los más abundantes en la lámina de agua son los de cadena corta -entre 5 y 7 átomos de carbono- mientras que en los sedimentos anóxicos persisten los de mayor peso molecular. Estos resultados son consistentes con los obtenidos en los ensayos de degradación aeróbica realizados en el laboratorio y están de acuerdo con la idea generalizada de que la biodegradación del LAS es muy lenta -o inexistente- en condiciones anaeróbicas.
8. Se ha encontrado en sedimentos de la bahía de Cádiz un máximo de la concentración de SPC a una profundidad a la que las condiciones son estrictamente anóxicas. La ausencia de bioturbación en esa zona hace que la difusión sea el único mecanismo de transporte implicado en el agua intersticial. De esta manera, la existencia de este máximo de concentración de diferentes metabolitos de la biodegradación del LAS sugiere que este proceso tiene lugar en condiciones anóxicas.